

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1936

THÈSE

N°

839

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Jacques-Max BRAUNBERGER

Né le 22 décembre 1909, à Paris

Contribution à l'Étude

de

l'Immunisation active du Lapin
contre le Bacille de Shiga

Travail de l'Institut Pasteur
Laboratoire de Microbie générale

Président : M. LAUBRY, Professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1936

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1936

THÈSE

N° —

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Jacques-Max BRAUNBERGER

Né le 22 décembre 1909, à Paris

Contribution à l'Étude

de

l'Immunisation active du Lapin
contre le Bacille de Shiga

Travail de l'Institut Pasteur
Laboratoire de Microbie générale

Président : M. LAUBRY, Professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1936

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	R. DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	Maurice VILLARET.
	LOEPER.
Clinique médicale	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CUNÉO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	MARION.
	BRINDEAU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.
Clinique de la tuberculose	BEZANÇON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

BÉNARD (H.) .. Pathologie médicale.
 BERNARD (E.).. Pathologie médicale.
 BOULIN Pathologie médicale.
 BULLIARD Histologie.
 CATHALA Pathologie médicale.
 CHEVALLIER .. Pathologie médicale.
 DOGNON Physique.
 FEY Urologie.
 GALLIARD Parasitologie.
 GASTINEL Bactériologie.
 DE GAUDART D'ALLAINES.. Pathologie
 chirurgicale.
 GAYET Physiologie.
 GIROUD Histologie.
 HAGUENAU ... Pathologie médicale.
 HALPHEN Oto-rhino-laryngologie.
 HAZARD Pharmacologie.
 HUGUENIN Anatomie pathologique.
 JOANNON Hygiène.
 LABBÉ (Henri) .. Chimie biologique.
 LACOMME Obstétrique.
 LANTUÉJOL .. Obstétrique.

MM.

LAROCHE (G.).. Pathologie médicale.
 LEMAIRE Pathologie expérimentale.
 LEVEUF Pathologie chirurgicale.
 M^{lle} J. LÉVY... Pharmacologie.
 LÉVY-VALENSI. Neurologie et Psychiatrie.
 MOREAU Pathologie médicale.
 MOULONGUET.. Pathologie chirurgicale.
 MOUQUIN Pathologie médicale.
 OBERLING Anatomie pathologique.
 PETIT-DUTAILLIS.. Pathologie chirurgi-
 cale.
 PIÉDELIEVRE .. Médecine légale.
 PORTES Obstétrique.
 RICHEL Physiologie.
 SANNIÉ Chimie biologique.
 SÈNEQUE Pathologie chirurgicale.
 TROISIER Pathologie expérimentale.
 TURPIN Pathologie médicale.
 VIGNES Obstétrique.
 WILMOTH Pathologie chirurgicale.
 Justin BEZANÇON.. Hydrologie.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

ALGLAVE Pathologie chirurgicale.
 BUSQUET Pharmacologie.
 CHAILLEY-BERT.. Physiologie.

MM.

LEROUX Anatomie pathologique.
 NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.
ABRAMI.
ALAJOUANINE.
AUBERTIN.
BRULÉ.
CHABROL.
CHIRAY.
DONZELOT.
DUVOIR.
LIAN.
VALLERY-RADOT
(Pasteur).
SÉZARY.

Clinique médicale.

MM.
BASSET.
BROCQ.
CADENAT.
GATELLIER.
HEITZ-BOYER.
MOURE.
QUÉNU.
SCHWARTZ.
VELTER.

Clinique chirurgicale.

MM.
ÉCALLE.
GUÉNIOT.
LE LORIER.
LÉVY-SOLAL.
METZGER.

Clinique obstétricale.

V. — CHARGES DE COURS

MM.
CHAILLEY-BERT, agrégé Éducation physique.
LEDOUX-LEBARD Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ Puériculture.
RUPPE Stomatologie.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES PARENTS

A MA FAMILLE ET A MES AMIS

A MON MAITRE

M. LE PROFESSEUR CHARLES LAUBRY

Professeur de Clinique Cardiologique
Médecin de l'Hôpital Broussais
Membre de l'Académie de Médecine
Commandeur de la Légion d'honneur

Qui, en me faisant le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse, m'a donné une preuve de sa bienveillance toute paternelle. Depuis le début de mes études médicales, il n'a cessé de me diriger et de me conseiller. Je n'oublierai jamais tout ce qu'il m'a appris et tout ce que je lui dois. En témoignage de mon inaltérable reconnaissance, de mon profond dévouement et de ma respectueuse affection.

A M. LE DOCTEUR LOUIS MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

Qui a eu la bienveillance de s'intéresser à ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de tous mes remerciements et de ma respectueuse reconnaissance.

A MON MAITRE

M. LE DOCTEUR JULIEN DUMAS

Chef de Service à l'Institut Pasteur

Qui a non seulement inspiré ce travail, mais encore a contribué à sa réalisation. Je lui dois mes connaissances bactériologiques. Il m'a prodigué ses conseils, ses enseignements et ses encouragements. Je tiens à lui exprimer ici ma très vive et très respectueuse gratitude pour l'affectueuse et si amicale sollicitude qu'il m'a toujours témoignée.

A MES MAITRES DE L'INSTITUT PASTEUR

M. LE PROFESSEUR RENÉ LEGROUX

Chef de Service à l'Institut Pasteur

Qui a conseillé et éclairé ce travail. En témoignage de ma vive gratitude et de mon respectueux dévouement.

M. LE PROFESSEUR C. LEVADITI

Chef de Service à l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

En hommage de ma reconnaissance et de mon fidèle respect.

M. LE PROFESSEUR M. WEINBERG

Chef de Service à l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

Hommage respectueusement dévoué.

A MES MAÎTRES DES HÔPITAUX

M. LE DOCTEUR P. HALBRON

Médecin de l'Hôtel-Dieu

Pendant le temps que j'ai passé près de lui, j'ai profité de ses conseils éclairés. Je tiens à le remercier pour toutes les marques de bienveillante amitié qu'il n'a cessé de me témoigner.

M. LE DOCTEUR CH. AUBERTIN

Professeur agrégé à la Faculté
Médecin de la Pitié

En témoignage de reconnaissance pour sa bienveillance, et en remerciement pour tout ce que j'ai appris dans son Service.

M. LE DOCTEUR CH. FLANDIN

Médecin de l'Hôpital Saint-Louis

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mon respectueux et fidèle attachement.

M. LE DOCTEUR G. MARCHAL

Médecin de l'Hôpital Tenon

Avec toute ma gratitude pour les précieux enseignements qu'il m'a prodigués.

A M. LE DOCTEUR DANIEL ROUTIER
Assistant de Cardiologie de l'Hôpital Broussais

A M. LE DOCTEUR JEAN WALSER
Assistant de Cardiologie à l'Hôpital Broussais

A M. LE DOCTEUR ROBERT LÉVY
Chef de Clinique à la Faculté
Assistant à la Pitié

A M. LE DOCTEUR PIERRE THIBAUT
Assistant à l'Institut Pasteur

Qui m'a si aimablement aidé dans l'exécution de cette thèse. En témoignage de mon affectueuse et amicale reconnaissance.

Contribution à l'Étude de l'Immunisation active du Lapin contre le Bacille de Shiga

INTRODUCTION

L'immunisation active contre le bacille de Shiga, est un problème qui a beaucoup préoccupé les bactériologistes, qui ont étudié la dysenterie bacillaire. Toute sa difficulté réside dans la toxicité des différents vaccins, toxicité qui contre-indique plus ou moins son emploi chez l'homme.

On a essayé de résoudre cette question en expérimentant sur le lapin, animal particulièrement sensible au poison dysentérique. C'est l'immunisation active du lapin qui fera l'objet de cette étude. Aussi, allons-nous commencer par décrire la maladie dysentérique de cet animal et indiquer la technique que nous avons suivie ; nous exposerons ensuite les principaux travaux qui se rapportent à l'immunisation du lapin, en même temps que nous signalerons des expériences personnelles dans les trois parties que comporte ce travail :

- Vaccination avec des corps microbiens ;
- Vaccination avec les deux variantes « Rough » et « Smooth » d'une même souche ;
- Vaccination avec la toxine dysentérique.

*
* * *

Ce travail a été effectué à l'Institut Pasteur, dans le Laboratoire de M. le Dr Dumas, que nous ne saurions trop

remercier de l'aide bienveillante et affectueuse qu'il nous a apportée. Il nous a généreusement donné le fruit de nombreuses expériences observées par lui sur la dysenterie.

Notre vive gratitude va également à M. le Dr Martin, Directeur de l'Institut Pasteur, qui a eu la bienveillance de s'intéresser à ce travail.

La maladie dysentérique expérimentale du lapin.

Le lapin est l'animal de choix pour l'étude du pouvoir pathogène du bacille de Shiga. Il est en effet, proportionnellement à son poids, infiniment plus sensible que la souris, le cobaye, le chien ou le singe. Il présente des symptômes cliniques dont il est aisé de suivre l'évolution et des lésions anatomo-pathologiques typiques.

En France, on a coutume de choisir des lapins de 4 mois, pesant environ 2 kilos. On réalise le même tableau clinique et anatomo-pathologique, que l'on injecte des bacilles vivants, des émulsions de corps microbiens desséchés ou de la toxine soluble. On détermine également les mêmes symptômes et les mêmes lésions du lapin, quelle que soit la voie d'introduction : sous-cutanée, intra-dermique, intra-masculaire, intra-cérébrale, intra-péritonéale, digestive, et dans une certaine mesure, quel que soit le nombre de doses mortelles injectées.

C'est à l'inoculation intraveineuse que le lapin est le plus sensible. De plus, c'est elle qui donne les résultats les plus constants dans la détermination de la dose minima mortelle, des cultures ou de la toxine.

Selon les souches, la dose mortelle varie, pour les cultures de 48 heures en bouillon, entre 10 et 0,25 cmc. et pour la toxine soluble, entre 0,2 et 0,006 cmc.

Pour tuer le lapin par voie sous-cutanée, il faut injecter une dose de culture ou de toxine généralement 8 à 10 fois plus forte que par voie intraveineuse ; les lapins présentent alors, outre les symptômes d'intoxication communs à tous les modes d'inoculation, une infiltration plus

ou moins étendue du tissu cellulaire sous-cutané, et parfois même une eschare.

La symptomalogie et l'anatomie pathologique de la maladie expérimentale du lapin, ont été bien étudiées par DOERR, DOPTER et M. NICOLE.

Les trois ou quatre premiers jours qui suivent l'inoculation sont marqués par peu de signes : amaigrissement et inappétence, c'est la période d'incubation.

A la période d'état, apparaissent trois symptômes importants : paralysies, diarrhée et amaigrissement. Les paralysies débutent généralement au train antérieur ; elles sont légères et s'accroissent rapidement : les deux pattes antérieures sont écartées, la tête basse. La moindre poussée engendre la culbute : « tête première ». Le train postérieur se prend également, la marche devient difficile, et le lapin quadriplégique se couche sur le côté. Pendant cette période d'état qui dure généralement de 1 à 3 jours, apparaissent également une diarrhée liquide qui souille les poils du périnée et un amaigrissement qui progresse rapidement, atteignant parfois 150 à 200 grammes par jour. Il s'accroît encore à la phase suivante : la phase de coma, qui peut durer de 2 à 6 jours.

On observe alors de la polypnée, et une diarrhée abondante. La mort survient parfois en 24 heures, mais souvent seulement au bout de plusieurs jours.

C'est là, la forme clinique la plus fréquente, mais il existe des formes purement nerveuses avec amaigrissement précoce et coma, et des formes uniquement intestinales avec cachexie progressive, diarrhée et mort en 15 jours. On rencontre surtout cette forme digestive lorsqu'on injecte une dose de toxine voisine de la dose minima mortelle. D'une manière générale, la diarrhée survient dans 30 % des cas et les paralysies dans 70 %. Signalons enfin qu'il n'est pas rare de voir, de temps en temps, la maladie s'améliorer : les symptômes nerveux et les troubles intestinaux s'amendent ; l'animal reprend du poids, et l'évolution se fera quelquefois vers la mort par maladie intercurrente, et le plus souvent, vers la guérison. Cette évolution favorable,

si elle est possible chez un animal paralysé ou même quadriplégié, est exceptionnelle à la phase de coma. C'est presque toujours par la mort, que celle-ci se termine.

Lorsqu'on saisit l'animal après la mort, on est frappé par sa maigreur. Il existe une véritable fonte des muscles de l'abdomen et des cuisses, contrastant avec la saillie de la vessie, bombant sous la paroi.

A l'autopsie, on trouve une vessie énorme, dilatée pouvant contenir jusqu'à 250 cmc. d'urine louche, mais non albumineuse. L'aspect du cæcum est pathognomonique : « Il est infiltré, dit Dopter, d'un œdème mou, gélatineux. Sa surface est congestionnée et parsemée de plaques rouges hémorragiques plus ou moins confluentes ».

On n'observe jamais de lésion du côlon transverse, ni du côlon descendant ; le grêle est parfois congestionné. Les ganglions mésentériques ne sont pas hypertrophiés ; les autres organes sont normaux. On note cependant quelquefois une légère congestion du foie et des reins.

Si on ouvre le cæcum, on voit qu'il est rempli de matières diarrhéiques. Après lavage à l'eau, la paroi et les valvules iléo-cæcales, apparaissent considérablement épaissies par l'œdème. Il existe, parsemant cette muqueuse, des suffusions sanguines plus ou moins étendues.

A un stade plus avancé, les plaques hémorragiques sont plus nombreuses, formant parfois de véritables ecchymoses. Il y a également des plaques de nécrose superficielles. A un troisième stade, presque jamais atteint, car le lapin meurt avant, la chute des eschares produit des ulcérations irrégulières à bords anfractueux, montrant un tissu sanieux et friable.

Dopter distingue des lésions microscopiques, correspondant à ces trois degrés d'altérations macroscopiques : inflammation catharrale d'abord de la muqueuse, avec altération des glandes ; épaississement du tissu interstitiel, et congestion vasculaire, intense. A un second stade la nécrose s'installe ; les glandes, les tissus interstitiels se mortifient, la muqueuse devient un amas de tissus granuleux amorphes. La sous-muqueuse est très congestionnée. A un troisième

degré, presque jamais atteint, le tissu mortifié se fragmente, forme des ulcérations qui respectent généralement la musculuse.

L'examen histologique de la moelle montre qu'il s'agit d'une polyomélite : lésion diffuse, intéressant la substance grise seule, avec des foyers de ramollissement nécrotiques.

Quelle est maintenant la pathogénie de cette maladie expérimentale ?

S'agit-il d'une infection ?

Presque tous les auteurs sont d'accord pour dire qu'on ne retrouve pas de bacilles de Shiga dans le sang d'un lapin qui a succombé à l'inoculation d'une culture microbienne. KRAUSS, DOERR et NICOLLE prétendent même qu'on n'en décèle pas non plus dans les viscères et particulièrement dans l'intestin. BESREDKA au contraire, soutient qu'on retrouve des bacilles dysentériques non seulement dans le cæcum, mais dans tout le tractus intestinal et encore dans la vésicule. C'est sur cette constatation qu'il s'appuie pour expliquer la pathogénie de la dysenterie. Il s'agirait, chez le lapin et chez l'homme, d'une « entéro-infection, comme le charbon est une cuti-infection ».

A cette théorie de l'infection du lapin, on peut objecter plusieurs arguments. D'abord, la différence d'aspect des maladies humaines et expérimentales : les ulcérations intestinales dans la dysenterie du lapin sont, nous l'avons dit, rares. Ensuite, le processus pathologique intéresse uniquement l'ampoule cæcale, alors que chez l'homme, c'est une véritable culture de bacilles dysentériques qui se développe du cæcum au rectum. De plus, la maladie du lapin n'est pas contagieuse : si l'on place dans la même cage un lapin qui a reçu une culture de bacilles de Shiga et des animaux sains, aucun de ceux-ci ne sera contaminé. En outre, pour infecter un lapin avec des glaires humaines, il faut lui faire ingérer au moins 10 cmc. des glaires d'un malade qui vient de contracter la dysenterie. C'est une dose énorme si l'on considère l'extrême contagiosité de la maladie humaine. Enfin, si le lapin faisait une entéro-infection, on devrait reproduire très facilement la maladie expérimentale en

l'inoculant par la voie digestive. Or, pour contaminer cet animal, il faut lui faire ingérer 5 à 10 cmc. de culture en bouillon, dose presque suffisante pour produire la dysenterie chez l'homme.

L'obtention du même tableau clinique et anatomo-pathologique, en employant de la toxine ou des corps microbiens, nous fait penser au contraire, qu'il s'agit d'une intoxication avec fixation élective de la toxine sur l'ampoule cæcale et sur la moelle, particulièrement au début, sur la moelle cervicale.

Mais par quelle voie lorsqu'on injecte sous la peau une culture vivante, la toxine libérée se fixe-t-elle sur ces organes ? Passe-t-elle par les voies nerveuse, veineuse ou lymphatique ? Cette question n'est pas résolue, aussi devons-nous nous contenter de conclure que le lapin est réfractaire à l'infection, mais sensible à la toxine dysentérique qui se fixe rapidement sur le cæcum et les centres nerveux.

Sensibilité particulière du lapin à l'intoxication dysentérique.

A côté de la sensibilité d'espèce, il semble qu'il existe une sensibilité particulière de chaque lapin au poison dysentérique.

L'âge, le poids et la race jouent certainement un grand rôle : les lapereaux sont — l'expérience l'a prouvé — plus réceptifs que les animaux adultes. Pourtant en dehors de ces causes évidentes, il existe chez les lapins de même provenance, de même âge et de même poids, une susceptibilité individuelle dont l'essence nous échappe. Il arrive quelquefois que, dans un dosage de toxine, effectué sur deux lapins de même poids, c'est l'animal injecté avec la plus faible dose qui seul succombe, alors que l'autre n'accuse aucun trouble.

Il nous a été donné au cours de cette étude, de faire des observations analogues. Voulant parachever le dosage de la toxicité de la souche 18 S, en même temps que nous vaccinions nos animaux, nous avons inoculé avec des dilutions différentes de la même émulsion-mère, sept lapins de poids sensiblement égal :

- le premier reçut un milliard $1/2$ de microbes par voie sous-cutanée ;
- le second un milliard par voie sous-cutanée également ;
- le troisième un milliard, mais par voie intraveineuse ;
- enfin, les quatre autres reçurent 400 millions de microbes par voie sous-cutanée, pour les vacciner.

Sur ces sept lapins : deux qui avaient été inoculés avec 400 millions de bacilles moururent avec des signes très

nets d'intoxication dysentérique. Les cinq autres ne présentèrent aucun symptôme. Pourtant si l'on observe, lorsqu'on injecte des microbes ou de la toxine peu pathogènes, des différences de sensibilité aussi accentuées, on ne les constate jamais en inoculant des microbes très virulents ou des toxines très actives.

Technique.

Dans chaque chapitre, nous donnerons des renseignements particuliers sur la technique que nous avons suivie, mais, signalons dès maintenant, que nous avons principalement injecté par les voies sous-cutanée et intradermique des émulsions microbiennes et de la toxine.

Quel que soit le traitement qu'on doive leur faire subir ensuite, les vaccins microbiens sont préparés en émulsionnant en eau physiologique une culture de 24 heures sur gélose, vérifiée préalablement au point de vue de sa pureté. Ces émulsions sont titrées à l'échelle d'opacité de Mestrésat, échelle évidemment inexacte en valeur absolue, mais dont les résultats approximatifs sont pourtant suffisants.

Pour les essais de vaccination, nous avons choisi après 8 jours de mise en observation, des lapins pesant environ 2 kilos, en bonne santé apparente.

Après la première inoculation, et pendant le temps que durera leur immunisation, les lapins sont examinés et pesés tous les 8 jours. Ils reçoivent deux injections soit d'émulsion microbienne à 15 jours de distance, soit de toxine formolée à 21 jours d'intervalle.

Trois semaines après la dernière inoculation, on éprouve les animaux, *toujours par voie intraveineuse*. Dans chaque lot, nous inoculons les lapins avec plusieurs doses mortelles de culture en bouillon, de toxine liquide, ou d'une émulsion de toxine sèche (1) préparées avec le bacille de Shiga 30, souche toxigène.

(1) Nous appelons toxine sèche, une suspension dans l'eau distillée, de corps microbiens desséchés dans le vide sulfurique, puis broyés.

Pour l'épreuve avec des microbes vivants, nous injectons une culture de 48 heures en bouillon (1) de bacilles de Shiga 30. La culture est pathogène pour le lapin à la dose de 0,5 ou de 0,75 cmc. La toxine le tue à raison de 0,02 ou 0,01 cmc. Quel que soit le mode d'épreuve, nous inoculons chaque fois plusieurs témoins, pour déterminer exactement la dose minima mortelle.

Quatre jours avant l'injection d'épreuve, on prélève 5 cmc. de sang au lapin, soit à la veine, soit au cœur, pour évaluer le pouvoir antitoxique du sérum. Comme l'antitoxine ne peut être titrée par la méthode de floculation de M. Ramon, on est obligé d'utiliser le dosage *in vivo*, dont la technique a été précisée par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations.

Nous déterminons la quantité d'antitoxine que contient le sérum des lapins, en mélangeant une émulsion de toxine dosée (2) (0 mgr. 30 de corps microbiens desséchés contenus dans 0,25 cmc.) avec 0,25 cmc. de sérum pur ou dilué de moitié. On laisse 45 minutes à l'étuve à 37°. Trois souris reçoivent une injection intraveineuse de 0,5 cmc. de chaque mélange. Les animaux sont observés pendant 7 jours.

Si toutes les souris survivent, nous concluons que 1/8 de cmc. de sérum contient une unité antitoxique et par conséquent, que 1 cmc. de sérum titre 8 unités. Si trois souris survivent 1 cmc. de sérum titrera 4 unités antitoxiques. Si toutes les souris meurent, le sérum n'a pas de pouvoir antitoxique décelable.

(1) Nous donnerons ultérieurement, la composition de ce bouillon, qui sert aussi à préparer la toxine liquide.

(2) On dispose d'un sérum anti-dysentérique étalon préalablement dosé, et dont 1 cmc. contient 200 unités antitoxiques. Ce sérum, dilué au 1/50, renferme une unité antitoxique dans 0,25 cmc. On prépare des émulsions de toxine sèche contenant 0,25 ; 0,30 ; 0,35 ; 0,40 mgr. de corps microbiens desséchés, dans 1/4 de cmc. d'eau distillée. On mélange dans une série de 4 verres les mêmes volumes de sérum dilué au 1/50 et d'émulsion de toxine, soit 2 cmc. On laisse 45 minutes à l'étuve à 37°. On injecte dans la veine de trois souris, 0,5 cmc. de chaque mélange. Pour juger du résultat, il faut que deux souris soient vivantes ou mortes. Notre toxine à la dose de 0,30 mgr. est neutralisée par 1/200 de sérum-étalon (I E). Au contraire, 0 mgr. 35 de toxine ne sont pas neutralisés par 1/200 de sérum, puisque 63 % des souris succumbent (L+).

*
* *

Nous allons exposer maintenant les résultats obtenus au cours des trois parties que comporte cet ouvrage :

- Vaccination avec les émulsions microbiennes ;
 - Vaccination avec les deux variantes « Rough » et « Smooth » d'une même souche ;
 - Vaccination avec la toxine dysentérique.
-

PREMIÈRE PARTIE

VACCINATION DU LAPIN AVEC DES ÉMULSIONS MICROBIENNES

Dans cette première partie, nous étudierons l'immunité active due à des vaccins préparés avec des émulsions microbiennes vivantes, ou atténuées par un agent physique ou chimique.

Nous verrons ensuite la valeur antigène des produits d'autolyse, et des microbes enrobés dans des corps gras.

Le dernier chapitre traitera de l'immunisation par la voie digestive.

CHAPITRE I

Vaccination avec des microbes vivants.

Ce mode d'immunisation en raison de la toxicité du germe a été peu utilisé, et, à part LUDKE, LENTZ et WINTER qui inoculaient des bacilles vivants par voie intraveineuse pour obtenir de bons immuns-sérums, il n'y a que BALTEANO à avoir tenté cette méthode de vaccination, par la voie cutanée. Cet expérimentateur reprend sur le lapin, des expériences que PETRUSCHKI avait faites sur l'homme, au cours d'une épidémie de dysenterie : il avait frotté la peau de quelques soldats tous les 2 jours, avec une pommade contenant des bacilles de Shiga, Flexner, Hiss, et paratyphiques.

Balteano émulsionne dans 40 cmc. d'eau physiologique le contenu d'une boîte de Roux. Sur la peau rasée de lapins, il frotte pendant 3 minutes avec un tampon de coton imbibé d'émulsion vivante, ou tuée par chauffage à 59°. Il en résulte une légère inflammation de la peau. Quelques jours après, nouvelle frotte. Trois animaux meurent en cours d'expérience ; les autres résistent 15 jours après à l'épreuve intraveineuse de 4 doses mortelles.

* * *

Nous avons tenté la vaccination de lapins, avec des émulsions vivantes par voie sous-cutanée, intra-dermique et dermique. Nous n'avons pas essayé la voie intra-veineuse, étant donné la sensibilité du lapin.

Par voie sous-cutanée, nous avons injecté à 15 jours d'intervalle deux doses de 200 millions de bacilles de Shiga vivants (souche 30), pensant au début que des quantités plus élevées seraient mal supportées par l'animal.

Par voie intra-dermique on fait 8 injections à 8 jours d'intervalle de 2/10 de cmc. d'une émulsion à 2 milliards, soit 400 millions de microbes.

L'injection d'épreuve a lieu trois semaines après la dernière inoculation.

Le tableau n° 1 donne le résultat de cette vaccination.

TABLEAU N° 1.

INJECTIONS SOUS-CUTANÉES ET INTRADERMIQUES DE VACCINS VIVANTS
(Souche Shiga 30).

Numéros des lapins et poids	Voie d'introduction	Quantité de microbes injectés	Observations	Unités antitoxi- ques du sérum	Doses d'épreuves par voie intra-veineuse	Résultats
B. 73 3 k. 200	Sous-cutanée	1 ^{re} inj. 200 Mons 2 ^e inj. 200 Mons		0	12 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
B. 75 2 k. 500		1 ^{re} inj. 200 Mons 2 ^e inj. 200 Mons		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma, + en 2 jours, œdème cœcal et rétention vésicale.
B. 81 2 k. 100		1 ^{re} inj. 200 Mons 2 ^e inj. 200 Mons		0	25 doses mortelles de culture en bouil- lon.	Quadriplégie, coma, + en 3 jours, œdème cœcal et rétention vésicale.
B. 36 2 k. 850	Intra-dermique	1 ^{re} inj. 400 Mons dans 2/10 cm ³ 2 ^e inj. do 3 ^e inj. do 4 ^e inj. do		4	4 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
B. 37 2 k. 200		1 ^{re} inj. 400 Mons dans 2/10 cm ³ 2 ^e inj. do 3 ^e inj. do 4 ^e inj. do		4	12 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
B. 39 2 k. 980		1 ^{re} inj. 400 Mons dans 2/10 cm ³ 2 ^e inj. do 3 ^e inj. do 4 ^e inj. do		4	20 doses mortelles de culture en bouil- lon	Survie.

On y voit que :

1° Les lapins injectés sous la peau ont résisté à l'épreuve de 12 doses mortelles de toxine liquide. Ils ont succombé à celle de 50 doses de toxine ou de 25 doses de culture en bouillon. Cette immunité légère s'explique par la petite quantité d'antigène inoculée.

Dans la seconde partie de cette thèse nous ferons de nouveaux essais de vaccination sous-cutanée avec des émulsions microbiennes, et nous verrons ce qu'il faut penser de cette quantité de microbes injectés.

2° La vaccination intra-dermique a préservé les lapins contre 12 doses mortelles de toxine liquide, et 20 doses de culture en bouillon ;

3° Le sérum des animaux qui ont reçu 400 millions de microbes par voie intra-dermique, titrait 4 unités antitoxiques.

Nous avons essayé également avec les émulsions vivantes des immunisations dermiques de type Balteano.

On scarifie la peau du front du lapin et on l'enduit d'une émulsion de 2 milliards de bacilles de Shiga vivants (souche 30). On fait 4 frictions à 8 jours d'intervalle. On éprouve les animaux trois semaines après.

Les résultats consignés dans le tableau n° 2 montrent que :

1° Les lapins n'ont pas résisté à l'épreuve de 4 doses mortelles de culture en bouillon ;

2° Leur sérum n'avait aucun titre antitoxique décelable.

TABLEAU N° 2.

VACCINATION DERMIQUE AVEC DES MICROBES VIVANTS

(Souche Shiga 30).

Numéros des lapins et poids	Mode de vaccination	Observations	Unités antitoxi- ques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
B. 40 2 k. 850	4 frictions de la peau scarifiée à 8 jours d'in- tervalle avec une émulsion à 2 M ^{ds} de micro- bes		0	4 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma, + en 6 jours, œdème cæcal et rétention vésicale.
B. 41 2 k. 650	4 frictions de la peau scarifiée à 8 jours d'in- tervalle avec une émulsion à 2 M ^{ds} de micro- bes		0	12 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma, + en 5 jours, œdème cæcal, rétention vésicale.
B. 42 2 k. 350	4 frictions de la peau scarifiée à 8 jours d'in- tervalle avec une émulsion à 2 M ^{ds} de micro- bes		0	10 doses mortelles de culture en bouillon	Quadriplégie, coma, + en 7 jours, œdème cæcal, rétention vésicale.
B. 43 2 k. 700	4 frictions de la peau scarifiée à 8 jours d'in- tervalle avec une émulsion à 2 M ^{ds} de micro- bes		0	20 doses mortelles de culture en bouillon	Quadriplégie, coma, + en 4 jours, œdème cæcal.

CHAPITRE II

Vaccins atténués par un agent physique : la chaleur.

Les émulsions microbiennes vivantes sont, nous venons de le voir, toxiques ; on a donc été contraint de les atténuer par des moyens physiques (la chaleur) ou chimiques (addition d'antiseptiques).

Le chauffage d'une heure à 58° tue le bacille de Shiga, mais ses effets toxiques, comme l'ont montré les travaux de Shiga sur lui-même, et ceux de KRUSE, KOLLE, HELLER, SELTER, DOPFER, NICOLLE, DEBAINS et LOISEAU sur les animaux de laboratoire ne sont que diminués.

Les expérimentateurs qui ont étudié la vaccination du lapin avec des émulsions microbiennes chauffées emploient deux voies d'introduction principales : sous-cutanée et intraveineuse.

THOMSON fait en 1916, à 10 jours d'intervalle, 3 injections sous-cutanées de 200, 400 et 600 millions de bacilles de Shiga, chauffés une heure à 60°, à 20 lapins. 7 animaux meurent du fait de cette vaccination. Les 13 autres résistent à l'épreuve par voie intra-veineuse, de 5 doses mortelles de bacilles vivants. Thomson pense que son émulsion contient un trop grand nombre de microbes ; il essaye alors sur 6 autres lapins les doses de 100, 300 et 900 millions de bacilles. Il perd 2 animaux après la première injection. Tous les autres résistent à la dose d'épreuve. Thomson conclut que les vaccins chauffés sont à rejeter parce que la chaleur non seulement ne détruit pas la toxine, mais altère l'antigène.

CHIBA se place à un point de vue un peu différent. Il a

constaté que le bacille de Shiga est tué par une heure de chauffage à 60°, ou 2 heures à 55°, et il compare l'action sur ce microbe, de la chaleur sèche et de la chaleur humide.

Les lapins supportent l'injection sous-cutanée de 0,4 mgr. de bacilles chauffés au bain-marie et de 1 mgr. de vaccin chauffé à l'étuve. Dix jours après, on éprouve les animaux par voie intra-veineuse : ceux du premier groupe résistent à 2 doses mortelles 1/2, et ceux du second, à 10 doses mortelles.

La vaccination du lapin par la voie intra-veineuse a été faite par TORIKOTA et FUJIMOTO avec leur « cocto-immunogène », c'est-à-dire avec une émulsion microbienne ou une culture de 8 jours en bouillon, chauffée 20 minutes à 100°. Ces expérimentateurs injectent au lapin, soit en 8 jours 11 cmc. d'émulsion ou 29 cmc. de culture en bouillon, soit en une seule fois 5 cmc. d'émulsion microbienne. Au bout d'une semaine on éprouve les animaux qui résistent à plusieurs doses mortelles de bacilles vivants. Leur sérum a des propriétés agglutinantes.

Vaccination par voie sous-cutanée.

Nous avons également tenté la vaccination des lapins par les voies sous-cutanées et intraveineuses avec des émulsions chauffées.

Des lapins reçurent, à 15 jours d'intervalle, deux injections sous-cutanées de 1 cmc. d'une émulsion à 2 milliards de bacilles de Shiga (souche 9) chauffée 1 heure à 70°. (Une émulsion à 2 milliards de microbes chauffés au-dessous de 70°, à 60° ou 65°, renferme suffisamment de toxine pour provoquer l'intoxication des animaux.)

Trois semaines après la dernière inoculation, avait lieu l'injection d'épreuve.

On voit dans le tableau n° 3 que les lapins n'ont pas résisté à l'épreuve de 12 doses mortelles de toxine liquide, ou de 25 doses de culture en bouillon. Leur sérum n'avait aucune propriété anti-toxique décelable.

TABEAU N° 3.

VACCINS CHAUFFÉS 1 HEURE A 70°, INJECTÉS
PAR LES VOIES INTRA-VEINEUSE ET SOUS-CUTANÉE

Voie d'introduction	Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes injectés	Observations	Unités antitoxi- ques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
<i>Intra-veineuse (souche Shiga 9)</i>	A. 3 2 k. 180	1 ^{re} inj. 1 M ^d 2 ^e inj. 2 M ^{ds} 1/2		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Gros amaigrissement, paralysie du train postérieur, + en 8 j. œdème cœcal et formation d'un bloc pulmonaire.
	A. 2 2 k. 850	1 ^{re} inj. 1 M ^d 2 ^e inj. 2 M ^{ds} 1/2		0	25 doses mortelles de toxine liquide	Amaigrissement, pa- ralysie du train pos- térieur, + en 6 jours, œdème cœcal et ré- tention vésicale.
	A. 9 2 k. 290	1 ^{re} inj. 1 M ^d 2 ^e inj. 2 M ^{ds} 1/2		0	10 doses mortelles de toxine liquide	Amaigrissement et paralysie transitoi- re. Survie.
	A. 6 3 k. 480	1 ^{re} inj. 1 M ^d 2 ^e inj. 2 M ^{ds} 1/2		0	20 doses mortelles de culture en bouil- lon	+ en 24 heures, pas de lésions macros- copiques.
	A. 8 2 k. 430	1 ^{re} inj. 1 M ^d 2 ^e inj. 2 M ^{ds} 1/2		0	10 doses mortelles de culture en bouil- lon	Quadruplégie, coma, + en 4 jours, œdème cœcal et rétention vésicale.
<i>Sous-cutanée (souche Shiga 30)</i>	B. 77 2 k. 550	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. d ^o		0	12 doses mortelles de toxine liquide	Quadruplégie, coma, + en 5 jours, œdème cœcal, rétention vé- sicale.
	B. 79 2 k. 750	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. d ^o		0	25 doses mortelles de culture en bouil- lon	Quadruplégie, coma + en 7 jours, œdème cœcal, rétention vé- sicale.

Immunisation par voie intra-veineuse.

Par voie intra-veineuse, des lapins reçurent à 15 jours d'intervalle deux injections de 1 milliard, puis de 2 milliards 1/2 de bacilles de Shiga (souche 30) chauffés une heure à 70°.

Trois semaines après, on les éprouvait.

L'examen du tableau n° 3 montre que les animaux ont résisté à l'injection de 10 doses mortelles de toxine, mais pas à 10 doses de culture en bouillon.

Leur sérum n'avait aucun titre antitoxique.

Immunisation mixte.

Avec une émulsion de microbes tués, puis de microbes vivants.

Nous avons émulsionné les microbes d'une culture de 24 heures, développés sur un tube de gélose, dans 10 cmc. d'eau physiologique (soit 10 milliards de microbes par cmc.) et les avons chauffés une heure à 58°. Nous avons commencé par injecter des doses faibles pour éviter l'intoxication. Des lapins reçurent à 10 jours d'intervalle : 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5 cmc. puis 2 fois 1 cmc. de cette émulsion, et on leur injecta ensuite 10 milliards et 15 milliards de bacilles vivants. Trois semaines après cette dernière inoculation on les éprouvait.

Le tableau n° 4 donne le résultat de cette immunisation.

On y constate que :

Les lapins ont survécu à l'injection d'épreuve de 100 doses mortelles de toxine sèche ou de 25 et 50 doses de culture en bouillon. Ils ont succombé à l'épreuve des 50 doses mortelles de toxine sèche.

TABLEAU N° 4.

VACCINS MIXTES INJECTÉS PAR VOIE INTRA-VEINEUSE

Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes injectés par voie intra-veineuse	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
A. 29 2 k. 015	1 ^{re} inj. 1/100 cm ³ de microbes tués 2 ^e inj. 2/100 cm ³ de microbes tués 3 ^e inj. 5/100 cm ³ de microbes tués 4 ^e inj. 1/10 cm ³ de microbes tués 5 ^e inj. 1/2 cm ³ de microbes tués 6 ^e inj. 1 cm ³ de microbes tués 7 ^e inj. 1 cm ³ de microbes tués 8 ^e inj. 10 M ^{ds} de microbes vivants 9 ^e inj. 15 M ^{ds} de microbes vivants	100 doses mortelles de toxine sèche	Survie.
A. 45 2 k. 100	1 ^{re} inj. 1/100 cm ³ de microbes tués 2 ^e inj. 2/100 cm ³ de microbes tués 3 ^e inj. 5/100 cm ³ de microbes tués 4 ^e inj. 1/10 cm ³ de microbes tués 5 ^e inj. 1/2 cm ³ de microbes tués 6 ^e inj. 1 cm ³ de microbes tués 7 ^e inj. 1 cm ³ de microbes tués 8 ^e inj. 10 M ^{ds} de micr. vivants 9 ^e inj. 15 M ^{ds} de microbes vivants	150 doses mortelles de toxine sèche	Mort immédiate.
A. 70 1 k. 980	1 ^{re} inj. 1/100 cm ³ de microbes tués 2 ^e inj. 2/100 cm ³ de microbes tués 3 ^e inj. 5/100 cm ³ de microbes tués 4 ^e inj. 1/10 cm ³ de microbes tués 5 ^e inj. 1/2 cm ³ de microbes tués 6 ^e inj. 1 cm ³ de microbes tués 7 ^e inj. 1 cm ³ de microbes tués 8 ^e inj. 10 M ^{ds} de microbes vivants 9 ^e inj. 15 M ^{ds} de microbes vivants	25 doses mortelles de culture en bouillon	Survie.
	1 ^{re} inj. 1/100 cm ³ de microbes tués 2 ^e inj. 2/100 cm ³ de microbes tués 3 ^e inj. 5/100 cm ³ de microbes tués 4 ^e inj. 1/10 cm ³ de microbes tués 5 ^e inj. 1/2 cm ³ de microbes tués 6 ^e inj. 1 cm ³ de microbes tués 7 ^e inj. 1 cm ³ de microbes tués 8 ^e inj. 10 M ^{ds} de microbes vivants 9 ^e inj. 15 M ^{ds} de microbes vivants	50 doses mortelles de culture en bouillon	Survie. Amaigrissement passager.

Le dosage de l'antitoxine du sérum de ces lapins n'a pas été effectué.

CHAPITRE III

Vaccins additionnés d'un antiseptique.

L'addition à un vaccin d'un produit chimique, a pour but comme le chauffage, d'atténuer ses effets toxiques, tout en lui conservant son pouvoir antigène. Aussi ce procédé a-t-il été essayé par de nombreux expérimentateurs pour immuniser les animaux contre le bacille de Shiga.

RUFFER et WILMORE, les premiers en 1908, se basant sur le fait que les toxines digérées artificiellement par la pepsine et l'acide chlorhydrique sont détruites en quelques heures, appliquent cette technique aux émulsions de bacilles de Shiga. L'injection sous-cutanée d'une dose mortelle d'émulsion chauffée, et traitée par ce procédé, non seulement ne produit aucun symptôme, mais encore immunise le lapin, qui résiste quelques jours plus tard à l'épreuve de 5 à 10 doses mortelles.

MANOUSSAKIS emploie les vaccins atténués par l'éther soit chauffés, soit ensoleillés. Il fait d'abord aux lapins plusieurs injections intra-veineuses de 1 à 1 cmc. 5 d'émulsion éthérée, chauffée entre 40° et 55°, et les éprouve 50 jours après avec deux doses mortelles de bacilles vivants. La plupart résistent. Les vaccins ensoleillés sont préparés en exposant l'émulsion aux rayons solaires 7 fois pendant 2 à 7 heures, à des intervalles variant entre 20 et 57 jours. On injecte par voie intra-veineuse aux lapins à 4 reprises, un vaccin correspondant à entre 4 et 34 doses mortelles de bacilles non traités. Les lapins résistent à 8 doses de bacilles vivants.

Nous n'insisterons pas sur les travaux de FROUIN et MOUSSALI qui atténuent la toxicité de leurs émulsions par des sels de terres rares (sulfate de thorium et de lanthane, de RANQUE et SENEZ qui emploient une solution iodo-iodurée, de JÖTTEN qui utilise l'antiformine, de VIOLE qui se sert du chlorure d'or, et de LAUBENHEIMER du cuivre. Ces expérimentateurs, en effet, s'occupent seulement de préparer un bon sérum agglutinant, et ne s'intéressent pas à la résistance des lapins à la dose d'épreuve.

DEAN et ADAMSON emploient des vaccins à l'eusol (solution aqueuse du produit obtenu en mélangeant du chlorure de chaux broyé et de l'acide borique en poudre). L'eusol n'est pas bactéricide, et les premiers lapins injectés avec des bacilles vivants additionnés d'eusol meurent. Aussi, Dean et Adamson emploient-ils des microbes tués par chauffage à 60°, qu'ils laissent 24 heures en contact avec l'eusol dilué. Les lapins vaccinés par voie intra-veineuse avec 1/5 d'anse de culture et 1/100^e d'eusol résistent à l'épreuve de 5 à 10 doses mortelles de microbes tués.

COPPINGER et ROBERTSON, reprenant les travaux de Thomson, dissolvent des bacilles de Shiga dans la soude, qu'ils neutralisent ensuite par l'acide chlorhydrique : il se produit un louche. Les expérimentateurs ajoutent de l'alcool et obtiennent un précipité abondant. Ce précipité émulsionné est injecté par voie intra-veineuse aux lapins, aux doses de 20, 200 et 400 millions de bacilles. Ces animaux résistent à l'épreuve de 10 doses mortelles de microbes vivants injectés par la même voie. Coppinger et Robertson ont l'idée également d'entraîner les bacilles dans un précipité de sulfate d'ammonium naissant. On ajoute à une émulsion microbienne dense une quantité égale d'ammoniaque concentrée. On laisse une nuit à 37° et on neutralise par de l'acide sulfurique à 20 %. Il se forme un gros précipité, qui, lavé et émulsionné, tue le lapin par voie intra-veineuse à la dose de 0 cmc. 25. Trois injections sous-cutanées à 7 jours d'intervalle de 0,5, 1 et 5 cmc., ou trois injections intra-veineuses de 0,1, 0,2 et 0,5 cmc. vaccinent contre 20 doses mortelles.

Deux produits chimiques ont encore été employés pour atténuer les vaccins : le phénol et le formol.

En 1916, THOMSON injecte sous la peau de 14 lapins, une émulsion de 50 millions de bacilles dans l'eau phéniquée à 0,5 %. Deux animaux meurent quelques jours plus tard, et les 12 survivants reçoivent encore une ou deux injections de 100 et de 400 millions de bacilles. On éprouve ensuite les lapins avec une injection intra-veineuse de bacilles vivants. Tous résistent à 1 milliard de bacilles, l'un d'entre eux supporte même 2 milliards. DITTHORN et LOWENTHAL ont également employé un vaccin additionné de phénol à 0,5 %, mais qui avait subi au préalable « un traitement physico-chimique ». Les lapins, disent-ils, supportent bien plusieurs injections.

Après les expériences de RAMON sur l'atténuation de la toxine diphtérique par le formol, de nombreux expérimentateurs ont essayé de faire subir un traitement analogue (1) soit à la toxine, soit aux émulsions de bacilles de Shiga ; c'est ce qu'on appelle « l'anatoxine totale ». Reprenant les expériences de DURAND qui avait vacciné des souris contre le bacille de Shiga, en ajoutant aux émulsions microbiennes 0,5 % de formol, et en laissant le mélange 15 jours à 37°, WHERRY et BOWEN essayent de « détoxiquer » ce microbe. Ils lavent trois fois leurs émulsions dans l'eau physiologique, reprennent par l'eau salée additionnée de 0,5 % de formol, et laissent 7 jours à 37°. Au bout de ce temps, nouveau lavage, nouvelle émulsion en eau formolée. On injecte par voie intra-veineuse à plusieurs lapins soit 0,2 soit 0,4 soit 1 cmc. de vaccin formolé. 40 jours après, les lapins résistent à une dose sûrement mortelle administrée par voie intra-veineuse.

SIMONETTI qui emploie des vaccins phénolés et formolés prétend avoir eu de meilleurs résultats avec ces derniers.

OTTEN et KIRSCHNER, vaccinent des lapins par les voies sous-cutanée et intraveineuse avec des émulsions tuées par chauffage d'une heure à 60°, auxquelles on ajoute 0,5 % de

(1) Sur lequel nous reviendrons plus tard.

formol. On fait trois injections à une semaine de distance. On inocule par voie sous-cutanée 0,5 puis 1 et 2 cmc. et par voie intraveineuse 0,2, 0,3 et 1 cmc. de vaccin. On éprouve les animaux 3 à 6 semaines après, soit par injection intraveineuse de 2 à 4 milliards, soit par ingestion de 80 milliards de microbes vivants :

48 % des lapins résistent à l'injection intraveineuse.
2 % seulement à l'absorption *per os*.

Enfin, LURJE, ROSENBLATT et KASSAREW ont immunisé le lapin contre 8 doses mortelles en lui inoculant sous la peau à trois reprises et à 5 jours d'intervalle une émulsion de 4 à 24 milliards de microbes formolés à 1,3 %.

* * *

Nous avons fait des essais de vaccination avec des émulsions à 2 milliards de bacilles de Shiga (souche 30) par centimètre cube dans l'eau additionnée de 0,3 % de formol et laissée 24 heures à 37°. Nous avons essayé deux modes d'immunisation :

- 1° Injection sous-cutanée à raison de 4 injections de 1 cmc. à 8 jours d'intervalle ;
- 2° Inoculation intradermique. Les lapins reçoivent tous les 8 jours 4 injections de 1 milliard de microbes contenus dans 0,5 cmc.

Tous les lapins furent éprouvés 3 semaines après la dernière injection.

Dans le tableau n° 5 où sont donnés les résultats de cette vaccination, on voit que :

1° Les animaux vaccinés avec des émulsions formolées injectées par voie sous-cutanée, ont résisté à 20 doses mortelles de culture en bouillon, et à 50 doses de toxine liquide, mais pas à 75 doses de toxine liquide.

2° L'immunisation intradermique, a préservé les lapins

contre 12 doses mortelles de toxine liquide, et 20 doses mortelles de culture en bouillon.

3° Le sérum des animaux éprouvés n'avait aucun pouvoir anti-toxique décelable.

TABLEAU N° 5.

VACCINS FORMOLÉS (Souche Shiga 30). EMULSION à 2 Mds par cm³.

Numéros des lapins et poids	Voie d'introduction	Quantité de microbes injectés	Observations	Unités antitoxi- ques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
A. 3 2 k. 450	Sous-cutanée	1 ^{re} inj. 2 Mds			75 doses mortelles de toxine liquide(1)	+ en 2 jours, œdème cœcal.
		2 ^e inj. 2 Mds				
		3 ^e inj. 2 Mds				
		4 ^e inj. 2 Mds				
A. 2 2 k. 375	Sous-cutanée	1 ^{re} inj. 2 Mds			50 doses mortelles de toxine liquide(1)	Survie.
		2 ^e inj. 2 Mds				
		3 ^e inj. 2 Mds				
		4 ^e inj. 2 Mds				
B. 56 2 k. 970	Sous-cutanée	1 ^{re} inj. 2 Mds		0	12 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
		2 ^e inj. 2 Mds				
		3 ^e inj. 2 Mds				
		4 ^e inj. 2 Mds				
B. 57 2 k. 900	Sous-cutanée	1 ^{re} inj. 2 Mds		0	20 doses mortelles de culture en bouil- lon	Survie.
		2 ^e inj. 2 Mds				
		3 ^e inj. 2 Mds				
		4 ^e inj. 2 Mds				
B. 46 3 k. 100	Intra-dermique	1 ^{re} inj. 2 Mds en 1/2 cm ³		0	12 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
		2 ^e inj. d ^o				
		3 ^e inj. d ^o				
		4 ^e inj. d ^o				
B. 47 3 k. 010	Intra-dermique	1 ^{re} inj. 2 Mds en 1/2 cm ³		0	20 doses mortelles de culture en bouil- lon	Survie.
		2 ^e inj. d ^o				
		3 ^e inj. d ^o				
		4 ^e inj. d ^o				

(1) Le dosage de l'antitoxine du sérum de ces deux lapins n'a pas été effectuée.

CHAPITRE IV

Vaccination du lapin avec un autolysat filtré.

C'est à CONRADI qu'on doit la démonstration de l'action toxique du produit d'autolyse du bacille de Shiga. Cet auteur émulsionne en eau physiologique une culture sur gélose, la laisse 48 heures à 37°, la dilue dans 5 fois son volume d'eau salée, puis filtre et évapore le filtrat à 35° dans le vide, jusqu'à réduction au 1/50 du volume initial.

Ce filtrat tue le lapin en injection intraveineuse, à raison de 0,1 cmc. avec des lésions dysentériques typiques. La plupart des animaux résistent à l'injection de 0,06 cmc.

NEISSER et SHIGA un peu plus tard chauffent une heure à 60° l'émulsion d'un tube de gélose dans 10 cmc. d'eau physiologique, la placent 48 heures à 37°, et filtrent sur bougie Berkefeld. Cet autolysat tue le lapin, en injection intraveineuse, à la dose de 0,5 à 0,2 cmc.

Selon la technique de VAILLARD et DOPTER le liquide toxique est obtenu par décantation dans l'eau des émulsions de cultures sur gélose tuées par le chloroforme, puis soumises à l'autolyse à 37° durant 20, 30 ou 40 jours.

LUDKE congèle des bacilles de Shiga par l'air liquide, les broie, les émulsionne et filtre sur bougie. Le filtrat est très toxique pour le lapin. HIRZFELD plus tard, oppose les extraits filtrés dont la dose mortelle pour le lapin est 0,1 cmc., aux extraits centrifugés qui tuent cet animal à partir de 0,5 cmc. La dose minima mortelle des extraits chauffés est de 0,5 cmc.

SHIGA dans son deuxième rapport à la Société des Nations, étudie différents procédés. Il émulsionne la même

quantité de microbes (2 mgr. par cmc.) soit en eau physiologique, soit en eau distillée. Chacune de ces émulsions est ensuite divisée en deux lots : l'un est chauffé à 60° pendant une heure, l'autre tué par le chloroforme. On laisse ces quatre suspensions 5 jours à la température du laboratoire, puis on centrifuge et on filtre. La dose mortelle pour le lapin est de 0,5 cmc. avec les suspensions chloroformées en eau distillée ou physiologique, et de 0,2 cmc. avec les émulsions tuées.

PERRY et COPPINGER comparent la toxicité des produits d'autolyse des bacilles de Shiga cultivés en aérobie et en anaérobie : ils lavent ces microbes en eau distillée ; les centrifugent, les émulsionnent dans une solution de carbonate de sodium ; chauffent une heure à 56°, et laissent autolyser une journée à 37°. Il y a une grande différence entre les autolysats aérobies et anaérobies. Les premiers tuent le lapin à la dose de 3 milliards de microbes par voie intraveineuse ; les seconds de 50 milliards. Ces auteurs essayent une expérience d'immunité portant sur un lapin qui reçoit 40 milliards de bacilles anaérobies autolysés, et, 28 jours après, 1 milliard de microbes aérobies autolysés aussi. On éprouve l'animal, 24 heures après, avec 5 milliards de bacilles vivants. Il survit, alors que les témoins meurent.

Enfin, PATAY a mis en valeur la relation qui existe entre la composition du milieu où sont ensemencés les bacilles de Shiga, et la toxicité de l'autolysat. Il prépare 3 bouillons : un bouillon Martin ; une décoction de viande de veau avec 1 % de peptone Chapoteaut ; et une autre décoction de viande de veau avec 2,5 % de la même peptone, 0,5 % de phosphate monopotassique et 0,2 % de citrate de soude. Ces milieux sont ajustés à pH 8,8, chauffés à 120°, additionnés de 3 % de gélose, répartis en boîte de Roux et stérilisés 30 minutes à 110°. PATAY ensemence ces trois milieux de la même manière, émulsionne les trois cultures de 24 heures dans la même quantité d'eau distillée, les additionne de chloroforme, les laisse 2 jours à 30° et les filtre. Il cherche ensuite, par injection intraveineuse au lapin, à déterminer la dose minima mortelle de ces filtrats : pour le premier

milieu elle est de 0,25 cmc. par kilogramme, pour le second de 0,04 cmc. et pour le troisième, de 0,025 cmc. On voit donc l'importance de la composition du milieu pour la toxicité des autolysats.

* * *

Nous avons utilisé le troisième milieu de Patay. On émulsionne la culture de 24 heures d'une boîte de Roux (souche Shiga 30) dans 150 cmc. d'eau distillée ; on laisse 3 jours à 37° et on filtre sur bougie L 3. L'injection de 0,02 cmc. de ce produit tue par voie intraveineuse le lapin en 6 jours. Une partie de ce filtrat a été utilisée directement comme vaccin, l'autre a été formolée à 4 % et placée un mois à 40°.

L'autolysat non traité est injecté à 3 lapins sous la peau, d'abord à la dose de 0,06 cmc. et 15 jours après de 0,1 cmc. Trois semaines plus tard a lieu l'épreuve.

L'autolysat formolé tue le lapin par voie intraveineuse à la dose de 10 cmc. On fait aux lapins deux injections sous-cutanées à 15 jours d'intervalle de 1 cmc. et on les éprouve trois semaines plus tard.

Le tableau n° 6 donne les résultats de cette vaccination.

On peut y constater que :

1° Les autolysats non modifiés prémunissent le lapin contre 12 doses mortelles de toxine liquide, mais pas contre 50 doses de la même toxine ou 25 doses de culture en bouillon ;

2° Les autolysats formolés vaccinent contre 4 doses mortelles de culture en bouillon mais pas contre 16 doses de toxine liquide ;

3° Le sérum des lapins immunisés avec l'autolysat non modifié n'avait aucun pouvoir antitoxique décelable.

Nous compléterons ces expériences dans la seconde partie de cette thèse.

TABLEAU N° 6.
VACCINATION AVEC UN AUTOLYSAT FILTRÉ
(Souche Shiga 30).

	Numéros des lapins et poids	Quantité injectée par voie sous-cutanée	Observations	Unités antitoxi- ques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
Autolysat, non modifié	B. 85 1 k. 980	1 ^{re} inj. 1/25 cm ³ 2 ^e inj. 1/25 cm ³		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Coma, + en 2 jours, œdème cœcal.
	B. 84 2 k. 700	1 ^{re} inj. 1/25 cm ³ 2 ^e inj. 1/10 cm ³		0	12 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	B. 87 2 k. 320	1 ^{re} inj. 1/25 cm ³ 2 ^e inj. 1/10 cm ³		0	25 doses mortelles de cult. en bouillon	Coma, + en 2 jours, œdème cœcal.
Autolysat formolé	A. 28 2 k. 000	1 ^{re} inj. 1/2 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³			16 doses mortelles de toxine liquide	Quadruplégie, coma, + en 4 jours, œdème cœcal.
	A. 69 1 k. 770	1 ^{re} inj. 1/2 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³			4 doses mortelles de culture en bouillon	Survie.
	A. 68 1 k. 600	1 ^{re} inj. 1/2 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³			3 doses mortelles de culture en bouillon	Survie.
	A. 32 2 k. 115	1 ^{re} inj. 1/2 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³			16 doses mortelles de toxine liquide	Quadruplégie, coma, + en 4 jours, œdème cœcal.

Le dosage des antitoxines du sérum des lapins immunisés avec l'autolysat formolé n'a pas été effectué.

CHAPITRE V

Lipo-vaccins.

LE MOIGNIC et PINOY ont les premiers l'idée, en 1916, d'incorporer des microbes dans un excipient huileux pour ralentir l'absorption et éviter les réactions locales et générales. Ils émulsionnent des bacilles typhiques et paratyphiques dans un mélange de lanoline et d'huile d'olive. Ils constatent que ce vaccin protège bien l'homme et l'animal, et qu'il ne détermine aucune réaction.

Bientôt après, ACHARD et FOIX confirment ces données et immunisent les cobayes contre une dose mortelle de bacilles paratyphiques B en employant un vaccin huileux renfermant des corps microbiens desséchés à l'étuve et chauffés une heure à 37°.

Deux ans plus tard, OLITZKY reprend ces expériences. Il emploie d'abord le vaccin de Le Moignic et Pinoy, dont il retire les corps microbiens en suspension. Il incorpore au liquide huileux des bacilles dysentériques. Il injecte par voie sous-cutanée aux lapins trois doses de 1,2 et 3 milliards de microbes. Ses animaux résistent à l'épreuve de 10 doses mortelles.

Olitzky a encore les mêmes résultats avec d'autres préparations : corps microbiens incorporés à un mélange de lanoline et d'huile d'olive ou d'amandes douces. Si on fait à des lapins une injection unique de 4 milliards de ce vaccin, ils résistent à l'épreuve de 10 doses mortelles.

C'est grâce à la lenteur du processus de résorption que les suspensions huileuses ne produisent pas de réaction locale ni générale. Un lapin est inoculé avec une émulsion

microbienne en eau physiologique : un autre animal reçoit une suspension huileuse contenant le même nombre de microbes. Vingt-quatre heures après l'examen de la sérosité locale du premier animal ne décèle aucun bacille, alors que chez le deuxième, les microbes ne disparaissent que le 3^e jour.

WHITMORE FENNEL et PETERSEN émulsionnent des bacilles desséchés puis tués par l'éther et le chloroforme en un mélange à parties égales d'huile d'amandes douces et de lanoline. Ce produit est bien supporté par le lapin dont le sérum acquiert des propriétés agglutinantes. Les expérimentateurs n'ont pas fait l'épreuve de l'immunité, mais ils pensent que les vaccins huileux sont à recommander car ils se résorbent lentement sans donner de réaction, et ne risquent pas de s'autolyser ou de se détruire.

Reprenant les expériences de RAMON et ses collaborateurs, qui étaient arrivés à rendre inoffensives pour le cobaye, plusieurs doses mortelles de toxine diphtérique ou tétanique en les mélangeant à un excipient huileux, BALSAMELLI a fait supporter au lapin, 4 doses mortelles de toxine dysentérique en l'incorporant soit à de la lanoline, soit à un mélange de cholestérine et d'huile d'olive. Il est regrettable que Balsamelli n'ait pas éprouvé ses animaux.

*
* *

Nous avons expérimenté des lipo-vaccins que nous devons à l'amabilité de M. Pons. Ils ont été préparés avec la souche Shiga 30, selon le procédé de Le Moignic et Pinoy, c'est-à-dire que les microbes morts ou vivants ont été incorporés à une huile végétale neutre supercentrifugée et ultrafiltrée, par l'intermédiaire d'un corps en partie miscible à l'eau et à l'huile, pour obtenir une suspension homogène. Ces vaccins contiennent 4 milliards de microbes par cmc. Nous avons essayé un vaccin vivant et un vaccin tué. Nous avons fait deux injections sous-cutanées de 1 cmc. à 3 semaines de distance. Vingt et un jours après la dernière inoculation, avait lieu l'injection d'épreuve.

TABLEAU N° 7.

IMMUNISATION AVEC UN LIPO-VACCIN VIVANT OU TUÉ
(4 Milliards par cm³).

	Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes injectés par voie sous-cutanée	Observations	Unités antitoxi- ques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
Vaccin vivant	D. 52 2 k. 880	1 ^{re} inj. 4 Mds	+ en 5 jours cœcum lég ^t œdématisé et intestin hé- morragique			
	A. 7 3 k. 480	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		0	75 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 56 1 k. 890	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		8	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 55 1 k. 700	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		8	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 53 2 k. 290	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		8	20 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie. Parésie et amaigr. passagers.
Vaccin tué	A. 10 2 k. 190	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		0	150 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma, + en 3 jours œdème cœcal, rét. d'urine.
	A. 11 2 k. 130	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		0	100 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, énorme amaigrissement. Survie.
	D. 60 2 k. 020	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		8	75 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Amaigrisse- ment passager.
	D. 57 1 k. 730	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		8	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Amaigrisse- ment passager.
	D. 58 1 k. 710	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		8	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 59 1 k. 860	1 ^{re} inj. 4 Mds 2 ^e inj. 4 Mds		8	20 doses mortelles de culture en bouil- lon	Survie. Parésie et amaigrissement pas- sagers.

Le tableau n° 7 indique les résultats obtenus.

1° Avec les lipo-vaccins vivants ou tués, on arrive parfaitement à protéger les lapins contre 75 doses mortelles de toxine liquide ou 20 doses de culture en bouillon ;

2° Les vaccins tués ne prémunissent pas l'animal contre 100 doses mortelles de toxine. Nous n'avons pu essayer ces doses avec des vaccins vivants ;

3° Le sérum de tous les animaux immunisés avec les lipo-vaccins tués et qui ont survécu, titrait 8 unités ; le sérum de ceux qui ont succombé n'avait aucun pouvoir antitoxique décelable. Par contre, le sérum du lapin, qui, immunisé avec le vaccin vivant, avait résisté à la plus forte dose de toxine, n'avait aucun titre antitoxique, alors que celui des autres animaux titrait 8 unités.

4° Un lapin est mort de lésion dysentérique après une première injection. C'est donc que le vaccin vivant, s'il est efficace, est parfois dangereux.

CHAPITRE VI

Vaccination digestive.

Pour éviter les réactions locales ou générales, plusieurs expérimentateurs ont essayé l'immunisation par voie digestive.

HIDA et TOYODA, les premiers, en 1907, constatent que le sérum des lapins ayant ingéré des bacilles de Shiga, soumis à l'action de la pepsine et de la trypsine, a des propriétés agglutinantes et bactériolytiques. SHIGA fait absorber des bacilles tués à des lapins qui ne résistent pas à l'épreuve de 0,1 cmc. de toxine. CHVOSTKEK donne *per os* 2 fois, à 8 jours d'intervalle, de fortes quantités d'émulsions microbiennes à des animaux, qui eux, supportent l'injection intra-veineuse d'une dose mortelle.

En 1919, BESREDKA publie ses travaux sur la vaccination digestive des lapins : il leur fait avaler 1/10 de la culture chauffée à 60° d'une boîte de Roux. 3 jours plus tard il renouvelle la dose. Il constate, après la première injection, l'existence dans le sérum des lapins d'agglutinines qui ne se forment plus après le deuxième repas. De plus, les lapins résistent à l'injection intra-veineuse d'1/10 de la culture d'une boîte de Roux, dose mortelle pour les témoins. BESREDKA conclut donc qu'il est facile de vacciner les lapins par la voie digestive.

D'autre part, comme il retrouve toujours, quelle que soit leur voie d'introduction, les bacilles dysentériques dans tout le tractus intestinal, il juge préférable de les amener là par la voie la plus directe. Pour lui, l'immunité est un phénomène d'ordre local, produit dans l'intestin grâce à

des érosions de la muqueuse intestinale, à la suite de la première ingestion. Aussi pour sensibiliser davantage cette muqueuse, emploie-t-il dans une deuxième série d'expériences un vaccin additionné de bile.

La principale objection qu'on puisse faire à Besredka est plutôt d'ordre théorique que pratique. Nous l'avons vu, bon nombre d'auteurs n'ont jamais retrouvé de bacilles de Shiga dans l'intestin des lapins. Aussi les expérimentateurs qui ont repris ces travaux, s'ils partagent son opinion sur l'efficacité de la vaccination *per os*, ne sont ils pas toujours d'accord avec lui sur la valeur de l'immunité locale.

KANAI introduit à la sonde, à trois reprises, à 10 jours d'intervalle, dans les voies digestives de lapins, des suspensions épaisses de bacilles de Shiga tués par chauffage à 60°. 4 animaux sur 11 survivent à l'injection d'épreuve de deux doses mortelles. Kanai montre également que l'adjonction de bile à l'émulsion ne donne pas de résultats plus satisfaisants.

COMBIESCO, MAGHERU et CALALB expérimentent deux entérovaccins. Ils font ingérer à 13 lapins 1/6 de la culture d'une boîte de Roux chauffée une heure à 60°. 3 lapins meurent du fait de la vaccination. Les 10 autres ne résistent pas 12 jours après, à l'injection intra-veineuse du 1/10 d'une émulsion en eau physiologique des corps de microbes développés sur un tube de gélose. Dans une autre série d'expériences, les lapins résistent à cette innoculation, mais après deux injections immunisantes. Combiesco et ses collaborateurs essayent également un entéro-vaccin au sulfate de soude. Ils chauffent l'émulsion d'une culture d'une boîte de Roux à 75°, centrifugent et refroidissent le culot à la glace. Ils ajoutent du sulfate de soude anhydre, desèchent dans le vide. Ils reprennent la poudre et l'émulsionnent en eau physiologique. Ils font ingérer, 4 fois de suite à 6 lots de lapins, 1 gramme, 0 gr. 50, 0 gr. 25, 0 gr. 15, 0 gr. 10 et 0 gr. 05 de ce produit, et les éprouvent 15 jours après. Les animaux qui ont reçu les plus faibles doses succombent. La plupart des autres survivent, mais

les auteurs constatent qu'ils ont trouvé de « grandes différences individuelles ». Enfin le sérum des animaux vaccinés ne contient pas d'agglutinines, mais une antitoxine qu'on met en évidence par dosage sur souris.

COMBIESCO et BRANNER observent que les extraits d'organes (intestin, rate et foie) d'animaux vaccinés ont contrairement au sérum, un pouvoir agglutinant très marqué pour le bacille de Shiga. Ils concluent à l'existence d'une production locale d'anticorps.

LESBRE et VERDEAU font ingérer à des lapins de 12 à 20 milliards de corps microbiens tués par une heure de chauffage à 58°. Les animaux qui n'ont fait que deux repas ne résistent pas à l'inoculation intraveineuse d'épreuve, alors que survivent la plupart de ceux qui ont été vaccinés à trois reprises.

MISS ENLWS utilise des cultures très jeunes dont elle dessèche les bacilles. Elle fait avaler 3 fois aux lapins, à 7 ou 10 jours d'intervalle, 2 millions de microbes par centimètre cube. Elle éprouve les animaux 18 jours plus tard : 57 % des lapins survivent. Miss Enlows qui a de meilleurs résultats avec la vaccination par injection, préfère pourtant la voie digestive, car moins dangereuse.

KLUCHIN et WOGODSTCHIKOFF immunisent des animaux contre l'injection intraveineuse d'une ou deux doses mortelles, en leur faisant ingérer pendant 3 jours 100 milliards de corps microbiens tués.

ALIVISATOS et JOVANOVITCH préparent un vaccin en ajoutant 0,25 % de lysol à des émulsions chauffées, qu'ils centrifugent. Ils dessèchent les microbes 2 heures à 46°, et les émulsionnent en eau physiologique. Ils trouvent que 80 mgr. de ce produit vaccinent contre 4 ; 60 mgr. contre 2 et 40 mgr. contre une dose mortelle de corps microbiens, injectés par voie intraveineuse. Avec 5) à 70 mgr. on protège contre 2 à 5 doses mortelles de toxine.

VAZ fait ingérer aux lapins de fortes doses de microbes tués (1 à 10 milliards). La plupart des animaux succombent au cours de la vaccination ; un petit nombre résiste à l'épreuve sous-cutanée, intraveineuse ou orale, de germes

vivants. MARAY et VAZ ont employé des vaccins faits avec des cultures formolées à 0,25 %. Une dose de 20 cmc. de produit immunise les animaux contre l'injection d'épreuve sous-cutanée de 500 millions de microbes vivants. De plus, ces auteurs ont remarqué que l'immunité va de pair avec le pouvoir antitoxique du sérum, et non pas avec son pouvoir agglutinant.

OTTEN et KIRSCHNER introduisent à trois reprises, à une semaine d'intervalle, à la pipette, dans la gueule de lapins, 40 à 80 milliards de microbes d'une émulsion chauffée à 60° et phéniquée à 0,5 %. Trois à 6 semaines après la dernière inoculation les lapins sont éprouvés, soit par ingestion de 80 milliards, soit par injection intraveineuse de 2 à 4 milliards de microbes vivants. Dans le premier cas 50 % des lapins survivent, et dans le second, 80 %.

Jusqu'ici, les expérimentateurs, s'ils ne sont pas tous d'accord avec Besredka au point de vue théorique, le sont au point de vue efficacité de la vaccination orale.

HUTTIG plus récemment reprend ces expériences et fait avaler à des lapins, au moyen d'une sonde, à un intervalle de 1 à 13 jours, de 2 à 180 milliards de cultures vivantes ou tuées à 60°. Deux heures avant l'ingestion, il donne 8 cmc. de bile de bœuf aux animaux. Sur 20 lapins, 4 ont résisté à l'administration intraveineuse d'une dose minima mortelle.

*
* * *

Nous avons essayé la vaccination orale avec des vaccins vivants ou tués, avec la souche Shiga 30. Les lapins étaient à jeun depuis 48 heures. On préparait le vaccin vivant en incorporant le 1/4 de la récolte d'un tube de gélose à un mélange de savon et de lanoline et en étalant le tout sur de la mie de pain. Pour le vaccin tué, on arrosait le pain d'une émulsion de 10 milliards de bacilles chauffée une heure à 70°.

Quel que soit le mode d'immunisation, on faisait faire deux repas aux animaux à 24 heures d'intervalle. Trois semaines après, avait lieu l'injection d'épreuve.

TABLEAU N° 8.
VACCINATION DIGESTIVE
(Souche Shiga 30).

Vaccin employé	Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes ingérée	Observations	Unités antitoxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
Vivant	A. 23 3 k. 050	1 ^{re} ingestion 1/4 d'une culture sur gélose 2 ^e ingestion d°		0	30 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma. + en 6 jours œdème cœcal, rétention vésicale.
	A. 21 2 k. 350	1 ^{re} ingestion 1/4 d'une culture sur gélose 2 ^e ingestion d°		0	10 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma. + en 3 jours rétention vésicale.
	A. 24 1 k. 950	1 ^{re} ingestion 1/4 d'une culture sur gélose 2 ^e ingestion d°		0	5 doses mortelles de toxine liquide	Gros amaigrissement, paralysie du train postérieur. Survie.
	A. 25 3 k. 020	1 ^{re} ingestion 1/4 d'une culture sur gélose 2 ^e ingestion d°		0	10 doses mortelles de culture en bouillon	Quadriplégie, coma. + en 5 jours œdème cœcal, rétention vésicale.
	A. 30 1 k. 800	1 ^{re} ingestion 1/4 d'une cult. sur gélose 2 ^e ingestion d°		0	5 doses mortelles de culture en bouillon	Quadriplégie, coma. + en 7 j. œdème cœcal, rét. vésicale.
Tué	A. 28 2 k. 600	1 ^{re} ingestion 10 Mds dans 2 cm ³ 2 ^e ingestion d°		0	10 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma. + en 4 jours œdème et hémorragie du cœcum, rétention vésicale.
	A. 27 1 k. 850	1 ^{re} ingestion 10 Mds dans 2 cm ³ 2 ^e ingestion d°		0	5 doses mortelles de toxine liquide	+ en 12 heures, pas de lésion macroscopique.
	A. 29 2 k. 550	1 ^{re} ingestion 10 Mds dans 2 cm ³ 2 ^e ingestion d°		0	5 doses mortelles de culture en bouillon	Quadriplégie, coma. + en 3 jours, œdème cœcal et rétention vésicale.

Le tableau n° 8 indique le résultat de ces expériences.

On y voit que le vaccin tué n'a pas protégé le lapin contre 5 doses mortelles de culture en bouillon ou de toxine liquide. Le vaccin vivant l'a seulement prémuni contre 5 doses de toxine.

Le sérum des animaux n'avait aucun titre antitoxique décelable.

CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

1° Parmi les différentes méthodes d'immunisation que nous avons employées, celles qui ont donné les moins bons résultats sont l'injection d'émulsions chauffées et les entéro-vaccins.

Nous avons eu plus de succès avec les autolysats filtrés et les vaccins vivants injectés par voie sous-cutanée. (Nous verrons plus loin, que, si nous n'avons pas obtenu une immunité plus forte, c'est faute d'avoir inoculé une assez grande quantité de microbes). Plus satisfaisantes encore, ont été les immunisations avec les vaccins vivants intradermiques, les vaccins mixtes et les vaccins formolés. Enfin, les meilleurs antigènes parmi ceux qui ont été passés en revue, semblent être les lipo-vaccins tués ou vivants, puisqu'ils protègent l'animal contre 75 doses mortelles de toxine liquide.

2° La recherche des antitoxines du sang des animaux immunisés, nous a donné les résultats les plus variables : tantôt des animaux avec un sérum à pouvoir antitoxique faible ou nul, supportaient un grand nombre de doses mortelles, alors que mouraient d'autres lapins dont le sang titrait plusieurs unités. Ces résultats s'expliquent par la difficulté qu'il y a à mettre en évidence des petites quantités d'antitoxine dans le sérum des animaux.

3° Nous avons éprouvé les lapins avec de la toxine liquide

ou sèche et des cultures en bouillon dont nous avons déterminé chaque fois, aussi exactement que possible, la dose minima mortelle. Les animaux ne paraissent pas réagir de la même façon à l'injection de plusieurs doses de ces différents produits. Par exemple : 20 doses mortelles de toxine sèche ou de culture en bouillon sont certainement plus nocives pour le lapin, que 20 doses de toxine liquide.

4° Il existe en outre, une sensibilité spéciale de chaque lapin vis-à-vis du même antigène. Quand on injectait à plusieurs animaux le même jour, la même quantité du même vaccin, certains ne faisaient aucune réaction apparente, d'autres étaient paralysés, d'autres même mouraient.

5° Presque tous les vaccins que nous avons utilisés jusqu'ici et qui se sont montrés efficaces, étaient plus ou moins toxiques et amenaient même parfois la mort dès la première inoculation. Par contre, ceux qui ont été apparemment bien tolérés (à part les vaccins huileux tués), protégeaient peu ou protégeaient mal l'animal.

Ainsi donc, nous ne sommes pas parvenus jusqu'à présent à immuniser le lapin, sans risquer de le choquer, et c'est ce que nous allons essayer de faire dans les deuxième et troisième parties de cet ouvrage.

DEUXIÈME PARTIE

VACCINATION
AVEC LES DEUX VARIANTES
« ROUGH » ET « SMOOTH »
D'UNE MÊME SOUCHE DE BACILLES
DE SHIGA

CHAPITRE I

Historique de la variation.

De nombreuses observations anciennes relatent des exemples de la variabilité microbienne, mais la conception actuelle est de date plus récente. BAERTHLEIN, le premier en 1918 observe de nombreux types de colonies et constate qu'il existe des rapports entre ces différents types et les réactions fermentatives, la pigmentation, les propriétés sérologiques et la virulence.

LEGROUX et MAGROU décrivent les colonies : « plissées » et les colonies « lisses » des cultures de collection du vibrion cholérique et d'autres bactéries, et insistent sur l'agglutinabilité des cultures en bouillon.

ARKWRIGHT en 1920 travaillant d'abord sur les bacilles dysentériques, puis sur les bacilles typhiques, et para-typhiques, distingue lui aussi 2 types principaux de variantes : « Rough » ou rugueux, et « Smooth » ou lisse, doués chacun de propriétés sérologiques particulières. Cette notion a été confirmée par bon nombre d'auteurs et, dès l'année suivante, COWAN décrit la variation des streptocoques, DE KRUIF celle du bacille leptisepticus, TOPLEY et AYRTON, puis GOYLE, celle du bacille enteridis ; plus tard, BRUCE WHITE essaiera de classer les Salmonelles d'après les propriétés agglutinantes de leurs variantes Rough.

Il existe donc 2 sortes principales de variantes Smooth (S) ou Rough (R) dont les caractères sont différents. Sur gélose d'abord les colonies S « ont une surface lisse et brillante ; elles sont surélevées en forme de dôme, rondes, avec des contours lisses réguliers bien définis, translucides ; exa-

minées à un faible grossissement elles apparaissent tout à fait lisses, ou seulement très légèrement et finement granuleuses ».

Les colonies R au contraire « sont plates et minces avec une légère bosse centrale. Elles ont un bord échancré, irrégulier ou dentelé ; la surface est grossièrement rugueuse rappelant l'aspect du maroquin à grains fins. A la lumière transmise, elles semblent légèrement opaques. A un faible grossissement, elles paraissent grossièrement granuleuses ».

Cultivés en bouillon, les bacilles S troublent uniformément le milieu. On obtient en émulsionnant les cultures sur gélose en eau physiologique, une suspension stable et homogène. Les microbes R inversement, lorsqu'ils sont cultivés en bouillon, se déposent presque toujours en amas au fond du tube et le liquide surnageant reste limpide. De même, il est généralement impossible d'obtenir en eau physiologique une émulsion homogène et stable de ces microbes. Cette instabilité semble due à la sensibilité des formes R aux électrolytes, sensibilité que l'on met encore en évidence par l'action de la tryptaflavine (réaction de Pampana) ou bien encore du réactif de Millon (réaction de Bruce White).

On admet généralement, tout au moins pour les bacilles de la série typhique et du groupe Salmonelle, qu'on isole de l'organisme des formes S. A partir de ces formes S, on obtient des variantes Rough, soit spontanément par vieillissement sur milieu de culture, soit par des moyens artificiels, tels que culture en bouillon additionné de sérum, laissée plus ou moins longtemps à l'étuve.

Il semble peu probable actuellement, malgré les modifications possibles des caractères de culture, que l'on puisse passer de la forme R à la forme S, contrairement à ce qu'avait pensé Arkwright lors de son premier mémoire. Cet auteur, a lui-même depuis, observé que ces aspects morphologiques sont souvent trompeurs. Ce qui distingue principalement les deux variantes ce sont leurs propriétés antigéniques différentes. Plus tard, Bruce White

dira que « ce qui caractérise essentiellement la variation c'est le changement intime de l'antigène somatique ».

En employant un sérum anti-variante R, et un sérum anti-variante S, on constate qu'ils ont des propriétés agglutinogènes différentes, tant au point de vue de la forme des agglutinats (gros flocons pour les formes S, petits granules pour les formes R), que des taux d'agglutination (chaque variante étant agglutinée faiblement ou pas du tout par le sérum préparé avec l'autre variante). De plus, un immun-sérum anti R pourra ne pas agglutiner du tout la variante S homologue, et agglutiner des bacilles R d'espèces voisines ; c'est ce que SCHÜTZE nomme cosmopolitisme. Enfin l'épreuve de l'absorption des agglutinines, comme l'ont montré Arkwright, Bruce White et Schütze, montre que ces deux variantes ont des propriétés absorptives bien différentes.

Existe-t-il maintenant une différence de virulence et de valeur antigène entre ces deux variantes ?

Dans le cas des bacilles des groupes typhiques et Salmonelles, la plupart des auteurs, TOPLEY, AYRTON, IBRAHIM et SCHÜTZE, WILSON, GRINNEL, PERRY FINDLAY et BENSTED affirment la supériorité des microbes S, et il n'y a que BRUCE WHITE et MALTANER pour prétendre que les deux variantes se valent au point de vue vaccination.

Pour le bacille de Shiga, le problème se présente sous un tout autre aspect. C'est un microbe qui produit une toxine et qui n'a pas de cils ; il ne présente donc pas d'antigène flagellaire, et nous ne lui considérerons qu'un antigène somatique. D'autre part, les variantes du bacille de Shiga ont été moins étudiées que celles du bacille de Flexner et de Sonne. Pourtant Bruce White, puis Arkwright ont mis en évidence deux notions importantes : ils ont déclaré que des variantes R pouvaient être isolées directement de l'organisme, et que la forme R pouvait être aussi toxigène que la forme S. C'est aussi l'opinion de WAALER.

Tout récemment, MESROBEANU, et CALALB s'appuyant sur des recherches de Boivin ont constaté, eux aussi, l'égale toxicité des deux variantes. Par contre, ils prétendent qu'au

cours des épidémies on isole de l'organisme une grande majorité de colonies S. Ils affirment aussi que le sérum des malades n'agglutine que des bacilles S. De même disent-ils, on peut préparer un bon immun-sérum anti S, mais il n'est pas possible d'obtenir un sérum agglutinant la variante R, au delà du 1/500. Enfin, ces auteurs concluent que seules les formes S possèdent un antigène complet glucido-lipidique, capable de précipiter en présence des immuns-sérums.

Nous allons étudier maintenant les propriétés antigènes et l'immunisation active en fonction de deux variantes R et S du bacille de Shiga.

CHAPITRE II

Technique de la Variation et Propriétés Sérologiques des Souches R et S.

1^o Technique de la Variation.

Pour étudier les propriétés antigènes des variantes R et S des différentes souches de bacilles de Shiga, il faut utiliser des immuns-sérums anti R et anti S. Pour préparer ces sérums, il faut donc commencer par employer une souche qu'on pourra faire varier facilement.

C'est ce que nous avons fait avec la souche Shiga 28. Cette souche originairement était smooth, tant par ses caractères de culture que, par ses propriétés antigéniques, sur lesquelles nous reviendrons. Nous avons donc ensemencé cette souche 28 S en bouillon additionné de sérum de lapin neuf à 1 pour 5. Après 8 jours d'étuve, on fit un isolement sur gélose inclinée, et quelques colonies d'aspect rugueux se développèrent. On en choisit une qui après plusieurs repiquages conservait cet aspect rough, et on obtint ainsi la souche 28 R, dont on vérifia la pureté antigénique. Avec ces deux souches 28 R, et 28 S, nous avons préparé des immuns-sérums qui serviront pour l'étude des autres souches.

Toutes les souches que nous avons étudiées (8, 18, 20, 21, 28, 31, 32, 33, 35 et 36) étaient originairement smooth. Après plusieurs repiquages successifs, elles présentaient toujours les caractères classiques : troublaient uniformé-

ment le bouillon, et donnaient sur gélose des colonies brillantes, lisses, bombées, à contours réguliers. Elles étaient agglutinées par le sérum anti 28 S à 1 pour 2500, et à moins d'1/100 par le sérum anti 28 R. Enfin, les épreuves d'agglutination non spécifiques, c'est-à-dire la recherche de l'instabilité en eau physiologique des émulsions, décrite par HORNUS, la réaction de PAMPANA, la réaction de MILLON, étaient négatives.

Ces souches étaient stables en eau physiologique même après chauffage à 100° pendant quelques minutes.

La réaction de Pampana, qui se fait en laissant 18 heures à 37° un mélange à peu près égal d'émulsion microbienne et de solution de trypaflavine à 1 p. 500 en eau physiologique, était négative : c'est-à-dire que les bacilles n'étaient pas agglutinés.

Négative également était la réaction de Millon qu'on recherche en émulsionnant une anse de culture de 24 heures sur gélose dans 3 cmc. d'eau distillée, en ajoutant 1 cmc. de réactif de Millon, en agitant et en chauffant quelques minutes au bain-marie à 100°; il ne se formait pas alors de précipité et l'émulsion restait homogène. Ainsi donc, d'après ces caractères, nous sommes partis de variantes S de bacilles de Shiga.

Nous avons obtenu leur variation en les ensemençant en bouillon nutritif additionné de 1 pour 5 de sérum anti 28 S. Nous avons fait un premier repiquage après sept jours, et un second après 19 jours d'étuve et avons isolé des colonies d'aspect Rough.

Toutes ces souches Rough après plusieurs repiquages présentent les mêmes caractères :

sur gélose, elles donnent des colonies rugueuses, ap-laties, opaques, à contours polycycliques.

cultivées en bouillon, elles poussent agglutinées au fond du tube, le liquide surnageant restant clair.

Elles sont instables en eau physiologique, leurs émulsions s'agglutinent spontanément, et précipitent après plu-

sieurs heures à la température du laboratoire ou de l'étuve ou après quelques minutes de chauffage à 100°.

Une solution de trypaflavine à 1 pour 500 en eau physiologique agglutine et teinte en jaune les microbes de ces souches. La réaction de Millon est positive : il se forme un abondant précipité rougeâtre, et le liquide qui surnage reste clair.

Enfin, ces souches sont agglutinées par le sérum anti 28 R à 1 pour 2.500 et par le sérum anti 28 S au-dessous de 1/800.

Il n'y a pas de différence morphologique ou bio-chimique entre les microbes étudiés.

2° Etude sérologique.

Avec dix de ces variantes 35 S et R, 32 S et R, 21 S et R, 33 S et R et 18 S et R, nous avons préparé des immuns-sérums selon la méthode classique en injectant des émulsions microbiennes aux lapins par voie intra-veineuse. Avec ces sérums, nous avons fait des épreuves d'agglutination croisée et d'absorption.

Les agglutinations ont été faites aux taux suivants : 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/2000, 1/2500, 1/3200, 1/4000, 1/6400 et 1/8000, avec des émulsions assez épaisses en eau salée à 1,5 ‰. On emploie cette concentration en raison de l'instabilité des formes R en eau physiologique.

Nous avons agglutiné chacune de nos variantes par des sérums homologues anti S et anti R, et par un sérum de lapin neuf qui peut parfois, selon Bruce White, agglutiner les variantes R à un taux élevé.

Le tableau n° 9 montre le résultat de ces agglutinations.

Chaque variante est donc agglutinée à un taux élevé par le sérum homologue et peu ou pas par le sérum hétérologue. Nous avons obtenu, contrairement à Mesrobeanu, Calalb et Crivat, de bons immuns-sérums anti R.

TABLEAU N° 9.

AGGLUTINATION DES VARIANTES R ET S

Emulsions de bacilles de Shiga	Sérum de lapin normal	Sérum anti S homologue	Sérum anti R homologue
35 S.....	<1/50	1/4000	<1/100
35 R.....	1/400	1/400	1/6400
32 S.....	<1/50	1/6400	<1/100
32 R.....	1/400	1/400	1/1600
21 S.....	<1/50	1/3200	<1/100
21 R.....	1/200	1/400	1/6400
33 S.....	<1/50	1/3200	<1/100
33 R.....	1/800	1/2000	1/3200
18 S.....	<1/50	1/3200	<1/100
18 R.....	1/400	1/800	1/6400

Etudions maintenant les relations des variantes entre elles par l'épreuve de l'absorption des agglutinines.

On met en présence 0,1 cmc. de sérum à absorber avec l'émulsion des microbes de 2 géloses inclinées, contenues dans 1 cmc. 7 d'eau physiologique. On ajoute 2 cmc. d'acide phénique à 5 %. On laisse 2 heures à l'étuve à 37° et une nuit à la glacière. On centrifuge. On recueille le liquide surnageant, c'est-à-dire le sérum absorbé. On agglutine ce sérum aux taux habituels avec des émulsions microbiennes. Pour chaque souche, nous avons préparé :

- un sérum anti S absorbé par une émulsion S
- un sérum anti S absorbé par une émulsion R
- un sérum anti R absorbé par une émulsion S
- un sérum anti R absorbé par une émulsion R

Nous avons agglutiné chacun de ces sérums par les deux variantes R et S de cette même souche.

Nous rapportons ci-dessous les résultats obtenus (tableau n° 10).

D'une manière générale, on voit que l'absorption d'un sérum par la variante homologue diminue fortement son pouvoir agglutinant pour cette même variante et qu'il n'en

est pas de même pour la variante hétérologue. C'est le cas de presque toutes nos souches, sauf les souches 21 et 33. En effet, l'agglutination de leur variante R avec le sérum R absorbé par S, se fait à un taux bien moins élevé qu'avant l'absorption. C'est donc que leur antigène S n'est pas tout à fait pur, et contient des fragments d'antigène R.

TABLEAU N° 10.

ABSORPTION DES AGGLUTININES DES IMMUNS-SÉRUMS
ANTI R ET S

Emulsions de bacilles de Shiga	Sérum anti S absorbé S	Sérum anti S absorbé R	Sérum anti R absorbé S	Sérum anti R absorbé R
35 S	1/100	1/4000	<1/100	<1/100
35 R	1/400	1/400	1/6400	1/400
32 S	1/400	1/6400	<1/100	<1/100
32 R	1/400	1/400	1/1600	1/400
21 S	<1/100	1/3200	<1/100	<1/100
21 R	1/200	1/200	1/2000	1/200
33 S	<1/100	1/3200	<1/100	<1/100
33 R	1/800	1/800	1/800	1/800
18 S	1/200	1/3200	<1/100	<1/100
18 R	1/400	1/400	1/6400	1/400

Inversement, les antigènes S des autres variantes (35, 32 et 18) et tous les antigènes R peuvent être considérés comme purs.

CHAPITRE III

Vaccination des lapins avec des variantes R et S d'une même souche.

Nous avons essayé l'immunisation du lapin avec des émulsions vivantes ou tuées et des autolysats formolés.

Les émulsions microbiennes des deux variantes, sont préparées en eau physiologique et on vérifie leur pureté antigénique par la réaction de Millon.

Nous avons tenté, au début, de doser la toxicité de ces souches par voie sous-cutanée. Mais étant donné la sensibilité particulière de chaque animal, les résultats ont été discordants. Comme nous l'avons déjà relaté, 2 lapins sur 4 ont été tués par l'injection de 400 millions de bacilles 21 S, et les 2 autres n'ont présenté aucun symptôme. Bien plus, les doses de 1 milliard et 1 milliard et demi ont été admirablement supportées. On a donc utilisé la voie intra-veineuse pour déterminer la toxicité des variantes employées comme vaccins (souches 28, 18, 21, 35).

Le tableau n° 11 montre les résultats de ce dosage.

1° La dose minima mortelle varie selon les souches entre 7 et 2 milliards de microbes ;

2° D'une manière générale, il ne semble pas y avoir de grosse différence de toxicité entre les 2 variantes d'une même souche.

TABLEAU N° 11.

DOSAGE DE LA TOXICITÉ PAR VOIE INTRA-VEINEUSE
DES ÉMULSIONS R ET S D'UNE MÊME SOUCHE

Numéro de la souche	Variante	Numéros des lapins	Poids	Quantité de microbes injectés	Résultats
18	R	A. 55	2 k. 080	3 Mds	Quadruplégie ; survie
		A. 54	1 k. 850	2 Mds	Quadruplégie + en 6 jours ; œdème cœcal, rétention vésicale
		A. 53	1 k. 850	1 Md	Survie
	S	D. 89	2 k. 160	3 Mds	Quadruplégie coma + en 4 jours Œdème cœcal, rétention vésicale
		D 93	2 k. 075	2 Mds	Survie
		D 92	2 k. 160	1 Md	Survie
21	R	C. 53	1 k. 910	5 Mds	+ en 2 jours, congestion pulmo- naire droite
		C. 56	1 k. 850	3 Mds	Parésie transitoire
		C. 57	1 k. 770	1 Md	Survie
	S	C. 74	2 k. 300	7 Mds	+ en 24 heures Pas de lésion macroscopique
		C. 49	1 k. 920	5 Mds	Survie
		C. 54	1 k. 870	3 Mds	Survie
28	R	C. 67	2 k. 350	7 Mds	+ en 24 heures Pas de lésions macroscopiques
		C. 65	2 k. 250	5 Mds	Survie
		C. 62	2 k. 050	3 Mds	Survie
	S	C. 64	1 k. 870	1 Md	Survie
		C. 68		7 Mds	+ en 24 heures Pas de lésions macroscopiques
		C. 63	2 k. 100	5 Mds	Survie
35	R	C. 62	2 k. 050	3 Mds	Survie
		C. 64	1 k. 870	1 Md	Survie
		C. 55	2 k. 000	5 Mds	+ en 24 heures Pas de lésions macroscopiques
	S	C. 52	1 k. 900	3 Mds	Quadruplégie coma, + en 6 jours Œdème cœcal, rétention vésicale
		C. 50	1 k. 650	1 Md	Survie
		C. 48	2 k. 070	5 Mds	+ en 2 jours Hyperémie cœcale, foyer congestif au poumon gauche
		C. 51	1 k. 900	3 Mds	Survie
		C. 47	1 k. 600	1 Md	Survie

I. — Vaccination avec des émulsions microbiennes vivantes.

Des lapins reçoivent 2 injections sous-cutanées à 15 jours d'intervalle de 1 cmc. d'émulsion des variantes vivantes R et S d'une même souche. Trois semaines après a lieu l'injection d'épreuve.

Les tableaux n^{os} 12, 12 *bis*, 13, 13 *bis*, indiquent les résultats obtenus :

1^o Avec la souche 28, variante R et S, nous avons essayé l'injection :

soit de deux fois 1 milliard de bacilles,
soit de 400 millions et 1 milliard,
soit de 200 et 400 millions.

a) L'injection de 1 milliard de bacilles a entraîné l'intoxication de tous les lapins en expérience. Deux seulement ont survécu, qui devaient, plus tard, résister à 150 doses mortelles de toxine sèche et à 20 doses de culture en bouillon;

b) L'injection de 400 millions puis de 1 milliard de bacilles R ou S a protégé les lapins contre 150 doses mortelles de toxine liquide et 30 doses de culture en bouillon (Une seule lapine en état de gestation n'a pas résisté à une dose inférieure);

c) L'inoculation de 200 millions puis de 400 millions de microbes a été très bien tolérée, mais ne vaccine pas, puisque les animaux ne résistent pas à 50 doses mortelles de toxine sèche ou à 13 doses de culture en bouillon;

2^o La quantité minima de bacilles vivants à injecter la première fois au lapin pour lui fournir une protection efficace, semble donc être aux environs de 400 millions. La quantité maxima paraît inférieure à 1 milliard, ce qui explique que nous ayons eu de si mauvais résultats dans notre première partie, en injectant à deux reprises 200 millions de microbes. Aussi, nous avons essayé avec les souches 18, 21 et 35 d'immuniser les animaux avec deux

TABLEAU N° 12.
VACCINATION AVEC DES BACILLES R VIVANTS
(Souche Shiga 28).

Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes injectés par voie sous-cutanée	Observations	Unités anti- toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
B. 9 2 k. 400	1 ^{re} inj. 1 Md	Paralysie du train post. + en 5 j., œdème cœcal.			
B. 11 2 k. 270	do	do			
B. 13 2 k. 300	1 ^{re} inj. 1 Md 2 ^e inj. 1 Md	Légère paralysie du train postérieur. Guérison.	4	150 doses mortelles de toxine sèche	Survie. Léger amaigrissement.
B. 15 2 k. 380	1 ^{re} inj. 1 Md 2 ^e inj. 1 Md	do	4	20 doses mortelles de culture en bouillon	Survie.
B. 20 3 k. 290	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		0	200 doses mortelles de toxine liquide	Quadruplég. coma + en 6 j. œdème cœc. et rétent. vésicale.
A. 13 2 k. 640	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		0	150 doses mortelles de toxine liquide	Amaigrissement. Survie.
A. 19 1 k. 950	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		0	100 doses mortelles de toxine liquide	Amaigrissement. Survie.
B. 24 2 k. 320	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		0	75 doses mortelles de toxine liquide	Quadruplégie, coma + en 4 j. cœcum hémorrag., rétent. vésicale; gestation.
B. 18 1 k. 960	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Paralysie transitoi- re. Survie.
A. 15 2 k. 350	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		0	30 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie.
B. 74 1 k. 920	1 ^{re} inj. 200 Mons 2 ^e inj. 400 Mons		0	50 doses mortelles de toxine sèche	Quadruplég. coma + en 3 j. œdème cœc. et rétent. vésicale.
B. 76 1 k. 990	1 ^{re} inj. 200 Mons 2 ^e inj. 400 Mons		0	100 doses mortelles de toxine sèche	Paralysie + en 24 h. œdème cœcal et rétention vésicale.
B. 80 2 k. 000	1 ^{re} inj. 200 Mons 2 ^e inj. 400 Mons		0	13 doses mortelles de cult. en bouillon	+ en 12 heures.
B. 78 2 k. 020	1 ^{re} inj. 200 Mons 2 ^e inj. 400 Mons		0	20 doses mortelles de culture en bouillon	Quadruplég. coma + en 4 j., œdème cœc. et rétent. vésicale.

TABLEAU N° 12 bis.
VACCINATION AVEC DES BACILLES « S » VIVANTS
(Souche Shiga 28).

Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes injectés par voie intra-veineuse	Observations	Unités anti- toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
B. 1 2 k. 500	1 ^{re} inj. 1 M ^d	Paralysie + de pneumonie			
B. 3 2 k. 570	1 ^{re} inj. 1 M ^d	Quadriplégie + ré- tention d'urine ; œdème cœcal.			
B. 5 2 k. 330	1 ^{re} inj. 1 M ^d	Quadriplégie, + ré- tention d'urine : œdème cœcal			
B. 7 2 k. 800	1 ^{re} inj. 1 M ^d	Quadriplégie + œ- dème cœcal, ré- tention d'urine			
B. 83 3 k. 100	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		0	200 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma + en 5 jours, œdè- me cœcal, réten- tion vésicale.
D. 96 2 k. 200	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		0	100 doses mortelles de toxine liquide	Amaigrissement. Survie.
A. 1 2 k. 200	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		0	75 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
B. 32 2 k. 800	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		0	30 doses mortelles de culture en bouil- lon	Amaigrissement. Survie.
B. 84 2 k. 080	1 ^{re} inj. 200 M ^{ons} 2 ^e inj. 400 M ^{ons}		0	100 doses mortelles de toxine sèche	+ en 12 heures.
B. 82 1 k. 920	1 ^{re} inj. 200 M ^{ons} 2 ^e inj. 400 M ^{ons}		0	50 doses mortelles de toxine sèche	+ en 48 heures œ- dème cœcal, réten- tion vésicale.
B. 86 1 k. 880	1 ^{re} inj. 200 M ^{ons} 2 ^e inj. 400 M ^{ons}	Réaction in- flammatoi- re locale	0	26 doses mortelles de culture en bouil- lon	+ en 12 heures.
B. 88 2 k. 020	1 ^{re} inj. 200 M ^{ons} 2 ^e inj. 400 M ^{ons}		0	13 doses mortelles de culture en bouil- lon	Paralysie du train postérieur, + en 3 jours, œdème cœ- cal et rétention vé- sicale.

VACCINATION AVEC DES MICROBES R VIVANTS

(Souches Shiga 18, 21 et 35).

Souche	Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes injectés par voie sous-cutanée	Observations	Unités antitoxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
18 R	C. 69 2 k. 295	1 ^{re} inj. 800 Mons	Quadriplégie, coma, + en 8 j. œdème cœcal, rétent. vésicale			
	C. 67 1 k. 920	1 ^{re} inj. 800 Mons 2 ^e inj. 800 Mons	Réaction inflammatoire locale	0	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	C. 74 1 k. 980	1 ^{re} inj. 800 Mons 2 ^e inj. 800 Mons	do	0	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	C. 73 1 k. 900	1 ^{re} inj. 800 Mons 2 ^e inj. 800 Mons		0	20 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie.
21 R	C. 87 2 k. 020	1 ^{re} inj. 400 Mons	Amaigrissement + de pneumococcie			
	C. 89 1 k. 950	1 ^{re} inj. 400 Mons	Amaigrissement + de pneumococcie			
	C. 83 1 k. 920	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md	Paralyse du train antér., guérison	0	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Parésie du train postérieur et amaigrissement passager.
	C. 85 1 k. 900	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Parésie du train antérieur et amaigr. passager.
35 R	D. 77 2 k. 580	1 ^{re} inj. 400 Mons	Quadriplégie, coma, + en 6 j. œdème cœcal et rétent. vés.			
	D. 80 2 k. 030	1 ^{re} inj. 400 Mons	Quadriplégie, coma, + en 6 j. œdème cœcal et rétent. vés.			
	D. 81 2 k. 300	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		4	25 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma + en 3 j., œdème cœcal, rétent. vés.
	D. 79 3 k. 020	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md	Légère parésie du train postérieur, guéris.	0	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 78 3 k. 500	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md	Quadriplégie, guéris.	0	75 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 76 2 k. 320	1 ^{re} inj. 400 Mons 2 ^e inj. 1 Md		0	20 doses mortelles de culture en bouillon	Survie. Parésie du train postérieur et amaigrissement transitoires.

VACCINATION AVEC DES MICROBES S VIVANTS

(Souches Shiga 18, 21 et 35).

Souche	Numéros des lapins et poids	Quantités de microbes injectés par voie sous-cutanée	Observations	Unités anti- toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
18 S	C. 79 1 k. 920	1 ^{re} inj. 800 M ^{ons}	Paralytie du train postér. Amaigr. + de pneumococcie			
	C. 77 1 k. 850	1 ^{re} inj. 800 M ^{ons}	+ en 48 h., léger œdème cœcal, rét. vésicale			
	C. 75	1 ^{re} inj. 800 M ^{ons}	Quadruplégie. Guérison	0	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Amaigris. et parésie transit. du train postér.
21 S	1 k. 920	2 ^e inj. 800 M ^{ons}				
	C. 81 1 k. 780	1 ^{re} inj. 800 M ^{ons} 2 ^e inj. 800 M ^{ons}		0	20 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie.
	C. 91 1 k. 810	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons}	Quadruplégie, coma, + en 8 j. œdème cœcal et rét. vésicale			
	C. 93 2 k. 070	do	do			
	D. 44 2 k. 255	do	do			
	D. 51 2 k. 150	do	do			
	D. 46 2 k. 410	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		8	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	C. 97 1 k. 780	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		0	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 45 2 k. 250	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		8	20 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie. Amaigrisse- ment.
35 S	D. 84 2 k. 100	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons}	Amaigris., + de pneumococcie			
	D. 86 2 k. 160	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons}	Amaigris., + de pneumococcie			
	D. 83 2 k. 480	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d	Réaction in- flamm. locale	0	75 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Léger amaigrissement.
	D. 87 1 k. 940	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		4	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 85 2 k. 070	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d	Parésie du train postér. Guéris.	4	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Amaigrisse- ment.
	D. 82 2 k. 230	1 ^{re} inj. 400 M ^{ons} 2 ^e inj. 1 M ^d		0	20 doses mortelles	Survie. Amaigrisse- ment.

injections, soit de 800 millions de bacilles, soit de 400 millions et de 1 milliard. Nos animaux résistaient alors à l'injection de 50 ou 75 doses mortelles de toxine liquide ou à 20 doses de culture en bouillon.

Nous pensons qu'il est préférable d'injecter 400 millions, puis 1 milliard de microbes qui immunisent aussi bien et paraissent mieux tolérés. Mais même dans ce cas, il semble que la dose vaccinante soit bien près de la dose toxique, puisque bon nombre de lapins ont été touchés lors de la première injection. Certains sont morts de maladie dysentérique typique, d'autres d'affections intercurrentes ;

3° Il ne semble toujours pas y avoir de rapport entre la quantité d'antitoxine du sang et la résistance de l'animal au poison dysentérique. Certains lapins, dont le sérum n'avait aucun titre antitoxique, ont supporté l'injection de 100 doses mortelles de toxine liquide, et d'autres, avec 4 unités antitoxiques, ont succombé à l'épreuve de 25 doses ;

4° *Enfin, il ne paraît pas y avoir dans le cas des émulsions de microbes vivants de différence au point de vue vaccination, entre les variantes R. et S.*

II. — Essais de vaccination avec des microbes tués par le chauffage.

Les lapins reçoivent deux injections sous-cutanées à 15 jours d'intervalle de 2 milliards de bacilles de Shiga 28 R et S, chauffés une heure à 70°.

Trois semaines après la seconde injection, on éprouve les animaux et l'on observe que, comme on peut le voir dans le tableau n° 14 :

1° Les injections ont été bien supportées ;

2° Cette vaccination ne semble pas satisfaisante, car presque tous les lapins ont succombé, sauf deux qui ont résisté à 13 et à 26 doses mortelles de culture en bouillon ;

3° On ne peut conclure, avec d'aussi mauvais résultats, de la supériorité d'une variante sur l'autre, au point de vue vaccination.

TABLEAU N° 14.

VACCINS CHAUFFÉS R (1 h. à 70°)
(avec les deux variantes de la Souche Shiga 28).

Variante	Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes injectés par voie sous-cutanée	Observa- tions	Unités anti- toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
R	B. 33 2 k. 350	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. 2 M ^{ds}		0	50 doses mortelles de toxine sèche	Quadruplégie, coma + en 4 jours œdème cœcal et rétention d'urine.
	B. 37 2 k. 420	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. 2 M ^{ds}		0	100 doses mortelles de toxine sèche	+ en 24 heures léger œdème cœcal.
	B. 41 1 k. 950	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. 2 M ^{ds}		0	13 doses mortelles de culture en bouillon	Survie, paralysie et amaigrissement passagers.
	R. 39 2 k. 250	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. 2 M ^{ds}		0	26 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie, paralysie et amaigr. passagers.
S	B. 45 2 k. 200	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds}	Réaction inflammatoire locale + de pneumococcie			
	B. 43 2 k. 090	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. 2 M ^{ds}		0	50 doses mortelles de toxine sèche	Quadruplégie, coma + en 4 jours œdème cœcal et rétention vésicale.
	B. 47 2 k. 120	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. 2 M ^{ds}		0	100 doses mortelles de toxine sèche	Quadruplégie, coma + en 5 jours œdème cœcal et rétention vésicale.
	B. 49 2 k. 070	1 ^{re} inj. 2 M ^{ds} 2 ^e inj. 2 M ^{ds}	Réaction inflamm. locale		20 doses mortelles de cult. en bouillon	+ en 24 h., pas de lésion macroscop.

III. — Vaccination avec des autolysats filtrés.

Nous avons préparé, selon la méthode indiquée précédemment, deux autolysats filtrés et formolés avec les variantes 28 R et S. Les lapins reçoivent à 15 jours de dis-

tance 2 injections sous-cutanées de 1 cmc. et sont éprouvés 15 jours après la dernière injection.

Nous signalons dans le tableau n° 15 les résultats obtenus, que l'on peut ainsi résumer :

TABLEAU N° 15.

VACCINATION AVEC DEUX AUTOLYSATS FILTRÉS ET FORMOLÉS PRÉPARÉS avec les deux variantes de la Souche Shiga 28.

Variante	Numéros des lapins et poids	Quantité de microbes injectés par voie sous-cutanée	Observations	Unités antitoxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
R	D. 35 2 k. 075	1 ^{re} inj. 1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		4	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 34 2 k. 280	1 ^{re} inj. 1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	50 doses mortelles de toxine liquide	+ en 12 heures, pas de lésion apparente.
	D. 32 1 k. 980	1 ^{re} inj. 1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	26 doses mortelles de culture en bouillon	+ en 12 heures, léger œdème cœcal.
	D. 33 2 k. 030	1 ^{re} inj. 1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		8	26 doses mortelles de culture en bouillon	+ en 12 heures, pas de lésion macroscopique.
S	D. 37 2 k. 420	1 ^{re} inj. 1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		4	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 36 2 k. 300	1 ^{re} inj. 1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Paralysie du train postérieur + en 2 jours, œdème cœcal.
	D. 38 1 k. 975	1 ^{re} inj. 1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	16 doses mortelles de culture en bouillon	Quadriplégie, coma, + en 4 jours œdème cœcal, rétention vésicale.
	D. 39	1 ^{re} inj. 1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		4	26 doses mortelles de culture en bouillon	Survie, amaigrissement passager.

1° Les autolysats sont bien tolérés ;

2° Ils vaccinent l'animal contre 25 doses mortelles de toxine liquide et 26 doses de culture en bouillon. Insistons encore sur la sensibilité particulière du lapin, puisque l'animal éprouvé avec une dose inférieure a succombé.

3° Le sérum des deux lapins qui ont survécu, titrait 4 unités antitoxiques. Par contre, un lapin dont le sang titrait 8 unités est mort 12 heures après l'injection d'épreuve ;

4° On a obtenu les mêmes résultats avec des autolysats préparés avec des microbes R ou S.

CONCLUSION DE LA DEUXIÈME PARTIE

1° On obtient de meilleurs résultats en employant des émulsions vivantes qui immunisent l'animal contre 150 doses mortelles de toxine liquide, que des émulsions tuées par la chaleur, ou des autolysats filtrés et formolés ; et si nous n'avons pas obtenu dans la première partie de cette thèse une immunité aussi forte en injectant des microbes vivants, c'est parce que nous n'avons pas utilisé une assez grande quantité d'antigène ;

2° Pas plus que précédemment, le dosage de l'antitoxine du sérum ne nous a renseigné à coup sûr, sur la résistance du lapin au poison dysentérique ;

3° Comme nous l'avons déjà vu, les émulsions microbiennes vivantes, si elles fournissent d'excellents vaccins, sont très toxiques pour l'animal, et nombreux sont les lapins qui ont succombé lors de la première injection ;

4° Les variantes R et S d'une même souche paraissent être également toxiques et avoir la même valeur antigène. On ne peut, comme dans le cas des bacilles typhiques, et paratyphiques, employer pour la vaccination une variante de préférence à l'autre. Il semble donc, que dans le cas du bacille de Shiga, il faille faire intervenir un facteur toxicité qui n'est pas influencé par la variation du microbe.

TROISIÈME PARTIE

VACCINATION AVEC LA TOXINE DYSENTÉRIQUE

Dans cette troisième partie, nous étudierons l'immunisation des lapins avec la toxine dysentérique liquide, c'est-à-dire avec le filtrat d'une culture en bouillon. Dans l'état actuel de nos connaissances on semble s'attacher à obtenir une toxine d'un grand pouvoir pathogène, car on a remarqué que la valeur d'un vaccin est fonction de la toxicité du filtrat dont il dérive. Il importe donc d'abord, de préparer une toxine active. Aussi, est-ce par là que nous commencerons cette troisième partie. Nous étudierons ensuite l'immunisation des lapins avec la toxine non modifiée, précipitée ou formolée et les vaccins associés.

CHAPITRE I

Toxine dysentérique.

Durant ces dix dernières années, de nombreux bactériologistes ont étudié la préparation de la toxine dysentérique : JONESCO MIHAESTI et POPESCO, FUKUHARA, SHIGA, KOLLE, HELLER et de MESTRAL, HIRSZFELD, OLITSKY et KLIEGER. Les travaux de ces différents auteurs peuvent être résumés ainsi :

- 1° la macération de viande peptonée doit être ajustée à pH 8,4 ;
- 2° le bouillon est réparti en couche mince dans des ballons ;
- 3° la culture est filtrée après 15 jours de séjour d'étuve à 37°.

PATAY a insisté sur le choix de la peptone Chapoteaut pour obtenir une toxine plus pathogène.

J. DUMAS a essayé d'augmenter la toxicité du poison dysentérique en cultivant le bacille de Shiga dans des milieux de culture différents, préparés avec des peptones sèches commerciales ou des peptones liquides, autodigestion de panse de porc, additionnées ou non de viandes. Au bouillon viande-peptone Chapoteaut, il a ajouté divers hydrates de carbone ou des facteurs de croissance. Il a constaté que le bouillon préparé selon la formule suivante, favorise la production de la toxine dysentérique.

Chair musculaire de veau blanc...	500 gr.
Peptone Chapoteaut.....	20 gr.
Chlorure de sodium.....	5 gr.
Phosphate disodique.....	20 gr.
Eau.....	1.000 gr.

On dégraisse la chair musculaire, on la hache et on la met à macérer dans l'eau à la température du Laboratoire. On chauffe ensuite cette macération à 50° pendant une heure, puis on la porte à l'ébullition pendant 1/2 heure. On la filtre alors sur papier Laurent préalablement mouillé pour arrêter les graisses. Ce bouillon de macération, versé dans une marmite, est chauffé à petit feu vers 80°, et on y ajoute par petites fractions, 20 grammes de peptone Chapoteaut (1), 5 grammes de sel, puis 20 grammes de phosphate disodique. Ce milieu est alors ajusté à pH 8,5. Les sels alcalino-terreux sont précipités par chauffage à l'ébullition pendant 5 minutes. On filtre de nouveau et on répartit dans des fioles de Fernbach sur une hauteur de 2 cm. (environ 1.200 cmc. de milieu par récipient). Le bouillon est ensuite stérilisé par chauffage discontinu une heure à 100° pendant 3 jours. Ce milieu très alcalin a une teinte foncée comparable à celle de la bière brune.

Après le premier chauffage à 100°, le degré de concentration des ions OH diminue, le pH est de 8,4, après le deuxième de 8,3, après le troisième de 8,2.

Ensemencement des ballons de bouillon.

Avant d'ensemencer, nous les laissons plusieurs heures à l'étuve à 37°. L'ensemencement est fait en versant dans chaque matras 40 à 50 cmc. d'une culture de bacilles dysentériques de 24 heures. Le lendemain, le bouillon se trouble au fond du ballon; et après 3 ou 4 jours, un voile se forme, gris, discontinu, épais et gras. Le trouble du milieu augmente, le voile persiste pendant le séjour à l'étuve, et le dépôt de microbes au fond du vase s'accroît. Dans ce bouillon laissé à l'étuve à 37°, le bacille dysentérique reste vivant pendant 25 jours.

(1) La peptone Chapoteaut est une digestion artificielle de chair musculaire de bœuf en milieu acide à une température de 56°. L'acide sulfurique contenu dans cette solution est précipité par la baryte, puis la solution de peptone est concentrée par le chauffage, et transformée en une masse pâteuse que l'on dessèche sous le vide. Ce produit dont la formule est inconnue, renferme des albumoses, des peptones et quelques acides aminés.

Le développement du bacille dysentérique modifie rapidement le pH du milieu qui était de 8,2 avant l'ensemencement. Durant les 4 premiers jours, le bacille dysentérique acidifie le bouillon par fermentation du glucose que contient la viande et le pH tombe à 7,2 au 4^e jour. A cette phase d'acidité succède une phase d'alcalinité par suite de la formation de carbonate d'ammoniaque aux dépens des substances albuminoïdes. Au 8^e jour, le pH atteint 7,7 : au 12^e jour : 8,1 ; au 16^e jour : 8,4 ; au 20^e jour : 8,7 et au 22^e jour de séjour : 8,8. Après 15 jours de séjour à l'étuve, on filtre sur terre d'infusoires et sur bougie L 3.

Il est enfin deux notions utiles pour l'obtention d'une bonne toxine, sur lesquelles J. Dumas insiste : le choix du microbe et le mode de conservation de la souche.

En déterminant la dose minima mortelle pour le lapin de différentes variétés de bacilles de Shiga, on voit que, selon les souches employées, elle est de 2 cmc., de 0,04 cmc. ou de 0,006 cmc. Aussi, utilisons-nous la souche Shiga 30 (souche Dopter de la collection de l'Institut Pasteur) qui tue généralement le lapin à raison de 0,008 cmc.

— Important également est le mode de conservation de la souche. Dumas ensemence le même jour, dans le même milieu, 3 origines du même microbe conservées de façon différente :

- soit en macération de viande gélatinée, gardée à la glacière ;
- soit en bouillon, repiquant le microbe toutes les 4 heures ;
- soit en repiquant quotidiennement un fragment de voile d'une culture poussée dans le milieu qui sert à fabriquer la toxine.

Si on filtre au bout de 15 jours ces différents bouillons et qu'on inocule chaque filtrat au lapin, on voit que seule la toxine du 3^e ballon amène la mort de l'animal à la dose de 0,005 cmc. alors que les deux autres toxines ne la provoquent qu'à la dose de 0,01 cmc.

Ainsi donc, on voit la nécessité qu'il y a, si l'on veut obtenir une bonne toxine, à employer une technique de préparation rigoureuse, à utiliser une souche toxigène repiquée chaque jour et poussant en voile.

CHAPITRE II

Vaccination avec de la toxine non modifiée.

L'idée de vacciner les lapins avec des filtrats de culture en bouillon non modifiés, revient à KRAUSS AWOKI et KOVACS. Ces auteurs emploient des cultures très jeunes, 24, 48 ou 76 heures, qu'ils filtrent sur papier Chardin. Ils prétendent que le produit ainsi obtenu est atoxique, et l'injectent à 9 jours d'intervalle à la dose de 1 et 3 cmc. par voie intraveineuse aux lapins, qu'ils, immunisent contre 4 doses mortelles de toxine ou une dose d'émulsion microbienne. Nous ne pensons pas qu'il y ait dans une culture jeune, un stade de développement microbien qui aboutisse à une substance antigène, qui ne soit pas de la toxine. Un tel filtrat au contraire, est plus ou moins toxique, car l'ingestion de 3 cmc. à un lapin, détermine des symptômes de paralysie.

Aussi, avons-nous essayé d'immuniser l'animal avec une toxine peu active, mais non modifiée. Nous avons employé un filtrat d'une culture de 15 jours spontanément peu toxique, qui tuait le lapin par voie intraveineuse à la dose de 1 cmc.

On fait 2 injections à trois semaines d'intervalle, de 1 cmc. d'une dilution au 1/10^e et de 1 cmc. de toxine pure. L'épreuve a lieu trois semaines après, et les résultats sont donnés dans le tableau n° 16.

TABLEAU N° 16.
VACCINATION AVEC LA TOXINE NON MODIFIÉE

Numéros des lapins et poids	Quantité de toxine injectée par voie sous-cutanée	Observations	Unités anti- toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
D. 63 2 k. 280	1 ^{re} inj. 0,1 cm ³	Erythème local, quadriplégie, coma, + en 7 j., œdème cœcal et rétention vésicale			
D. 62 2 k. 170	1 ^{re} inj. 0,1 cm ³	do			
D. 21 2 k. 170	1 ^{re} inj. 0,1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
D. 23 2 k. 070	1 ^{re} inj. 0,1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Paralysie et amaigrissement transitoires.
D. 61 2 k. 200	1 ^{re} inj. 0,1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³	Erythème local passager	0	20 doses mortelles de cult. en bouillon	+ en 24 heures lég. œdème cœcal.
D. 20 2 k. 000	1 ^{re} inj. 0,1 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	10 doses mortelles de culture en bouillon	Survie.

On y voit que :

1° Ce produit est éminemment toxique, car plusieurs animaux sont morts lors de la 1^{re} injection de 0,1 cmc.

2° Les lapins qui ont supporté la 1^{re} inoculation, ont résisté ensuite à l'épreuve de 50 doses mortelles de toxine liquide, mais pas à celle de 20 doses de culture en bouillon.

3° Les sérums des animaux éprouvés n'avaient aucun titre antitoxique.

CHAPITRE III

Vaccination avec la toxine précipitée.

Préparation. — La toxine dysentérique, comme les autres poisons microbiens, adhère aux protéines du bouillon et est précipitée par le sulfate d'ammoniaque. Dans un vase à saigner contenant 500 gr. de sulfate d'ammoniaque stérilisé à l'autoclave, on verse, par petites fractions, un litre de toxine filtrée que l'on mélange avec un agitateur pour faciliter la dissolution. Un précipité abondant tombe au fond du vase et un autre, de couleur brune, se collecte à la surface. Après quelques heures, le liquide est versé dans un grand pot à centrifuger. On recueille ensuite, le culot que l'on dissout dans 100 cmc. d'eau distillée. On filtre sur papier stérile et on dessèche le précipité sous le vide sulfurique. Ce précipité broyé au mortier est une poudre brune qui reste sèche dans un flacon bouché à l'émeri.

Le rendement de toxine précipitée varie entre 8 et 11 gr. par litre de toxine additionnée de 500 gr. de sulfate d'ammoniaque.

Action pathogène de la toxine précipitée.

L'injection intraveineuse au lapin d'une forte dose 0 gr. 01 détermine rapidement, en moins de 48 heures, des symptômes d'intoxication dysentérique mortelle. Souvent immédiatement après l'injection, l'animal est pris de dyspnée, de tremblements et meurt pendant la nuit.

A dose moindre, 0 gr. 001, les symptômes dysentériques

paralyisie et diarrhée surviennent après 48 heures, et provoquent après 2 à 3 jours, la mort de l'animal. Des doses plus faibles ne déterminent aucun trouble.

Le cobaye succombe après des injections intrapéritonéale (0 gr. 01), sous-cutanée (0 gr. 03) ou intraveineuse (0 gr. 03). Cette toxine est pathogène pour la souris par voie intra-péritonéale (0 gr. 005), sous-cutanée (0 gr. 005) et intraveineuse (0,001).

Vaccination des lapins.

Pour vacciner les lapins, on leur injecte sous la peau à deux reprises, à trois semaines d'intervalle, 0 gr. 001 et 0 gr. 0025 de cette toxine précipitée. On les éprouve 3 semaines après la dernière inoculation.

Le tableau n° 17 résume les résultats obtenus.

TABEAU N° 17.

VACCINATION AVEC LA TOXINE PRÉCIPITÉE

Numéros des lapins et poids	Quantité de toxine injectée par voie sous-cutanée	Observations	Unités anti-toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
C. 6 2 k. 580	1 ^{re} inj. 1 mgm	Quadriplégie, coma, + en 9 j. œdème cœcal et rétention vésicale			
C. 5 2 k. 350	1 ^{re} inj. 1 mgm 2 ^e inj. 2 mgm5		0	100 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Amaigrissement.
C. 2 2 k. 700	1 ^{re} inj. 1 mgm 2 ^e inj. 2 mgm5		4	75 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
C. 3 2 k. 300	1 ^{re} inj. 1 mgm 2 ^e inj. 2 mgm5		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
C. 1 2 k. 430	1 ^{re} inj. 1 mgm 2 ^e inj. 2 mgm5	Quadriplégie, coma, guéris.	0	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
C. 4 2 k. 150	1 ^{re} inj. 1 mgm 2 ^e inj. 2 mgm5		2	20 doses mortelles de culture en bouillon	Quadriplégie, coma + en 3 jours œdème cœcal.

1° Si la plupart des animaux ont résisté à la première inoculation de 1 milligramme, deux ont été touchés par le poison dysentérique : le premier a succombé, l'autre a guéri. C'est donc un produit aussi toxique que la toxine non modifiée.

2° Les lapins survivent à 100 doses mortelles de toxine liquide mais sont tués par 20 doses de culture en bouillon.

3° Le sérum des animaux qui ont le mieux résisté n'avait aucun titre antitoxique.

CHAPITRE IV

Vaccination avec la toxine formolée.

I. — Préparation et Propriétés de la Toxine formolée.

Les travaux de RAMON sur la transformation de la toxine diphtérique sous l'action combinée du formol et du séjour à l'étuve à 40° en une anatoxine, qui a perdu sa nocivité, mais garde son pouvoir antigène, ont été suivis de nombreux essais d'atténuation de la toxine dysentérique.

DUMAS RAMON et SAID BILAL additionnent de 0,4 % de formol le filtrat d'une culture en bouillon de bacilles de Shiga, qui tue le lapin à la dose de 0,1 cmc. Ils mettent le mélange 40 jours à l'étuve à 37° et obtiennent un produit bien supporté par l'animal, même à la dose de 10 cmc. par voie intraveineuse. Ils le vaccinent également par deux injections sous-cutanées à 10 jours d'intervalle de 0,5 et de 1 cmc., contre 8 doses mortelles de toxine inoculée par voie intraveineuse, ou 6 doses de culture en bouillon injectées par voie sous-cutanée.

LESBRE et VERDEAU puis LESBRE utilisent le filtrat d'une culture de 3 semaines en bouillon Martin, qu'ils formolent à 0,3 % et maintiennent 20 jours à 40°. L'injection sous-cutanée, à 3 reprises et à 5 jours d'intervalle de 2 cmc. de cette toxine formolée ne cause aucun trouble au lapin. Trois injections de 8 cmc. ont déterminé une paralysie transitoire et un amaigrissement marqué. Cette anatoxine ne paraît pas stable, car une nouvelle addition de formol ou de lessive de soude en

augmente la toxicité. Par contre, la formolisation à 0,6 % d'emblée semble donner un excellent produit bien toléré par les animaux, qu'on immunise par voie digestive ou sous-cutanée, avec 2 ou 3 inoculations de 2 cmc., contre une dose mortelle. Enfin, ces auteurs remarquent que le formol donne de bien meilleurs résultats que les corps chimiques voisins, tels l'aldéhyde éthylique ou l'urotropine.

GLATOW utilise une culture en bouillon filtrée au bout de 21 jours sur papier, additionnée de 0,4 % de formol, et laissée à l'étuve à 40° pendant 25 à 35 jours. Ce produit est toléré par le lapin, qu'il vaccine par voie sous-cutanée ou intraveineuse. Moins bons sont les résultats d'immunisation par voie digestive. Le sérum des animaux vaccinés possède des propriétés antitoxiques.

DE ASSIS pense que le formol diminue la toxicité des filtrats de culture en bouillon, et davantage à 37° qu'à la glacière. L'atténuation à 37°, souligne-t-il, n'est pas complète, pas même avec une concentration élevée en formol (1 %), et il refuse à la toxine formolée le nom d'anatoxine. Il obtient cependant avec ce produit, en 20 jours, l'immunisation de l'animal contre des bacilles vivants et pathogènes.

DUMAS RAMON et SAID BILAL reprennent un peu plus tard leurs travaux en utilisant une toxine active. Ils emploient le bouillon dont nous avons donné la composition, filtrent au bout de 15 jours sur bougie L. 3. Ils ajoutent 0,6 % de formol à 40 % à ce filtrat, qui tue le lapin à la dose de 0,04 ou 0,025 cmc. et mettent le mélange à l'étuve à 37°. Après 15 jours, c'est 5 cmc. de ce produit qui est la dose minima mortelle par voie intraveineuse. Après un mois, l'injection de 10 cmc. est bien supportée par l'animal. Ces expérimentateurs trouvent que 0,6 % de formol est la dose optima à ajouter à leur toxine pour obtenir une anatoxine. Une concentration inférieure en formol est insuffisante, puisque, même après un mois de séjour à l'étuve, la toxine ainsi traitée provoque la mort du lapin par injection intraveineuse de 5 à 6 cmc. Si l'on ajoute des doses supérieures de formol

(0,7 à 0,08 %), les propriétés antigènes de l'anatoxine sont diminuées. Dumas, Ramon et Said Bilal confirment leurs expériences antérieures d'immunisation. Ils constatent en outre que le chauffage 45 minutes à 65° diminue les propriétés antigènes de l'anatoxine.

C'est aussi l'avis de ISABOLINSKY et KARPATCHEWS-KAJA qui ajoutent 0,5 % de formol à leur toxine et la laissent 6 jours à 48°. Ils font aux lapins 3 à 5 injections à 5 jours d'intervalle de 0,5, 1, et 2 cmc. par voie sous-cutanée, ou intraveineuse. Ils ne trouvent pas de différence au point de vue vaccination entre ces deux voies d'introduction, mais ils pensent que la propriété immunisante d'une anatoxine est fonction de l'activité initiale de la toxine qui a servi à sa préparation : ils protègent le lapin contre 5 à 6 doses mortelles, en employant une toxine formolée, dont la dose minima mortelle était lors de sa filtration 0,5 cmc. Ils l'immunisent contre 200 doses mortelles, avec une anatoxine qui tuait avant formolisation, à raison de 0,02 cmc.

GRILLO part de toxines excessivement actives (tuant le lapin entre 1/700 et 1/1200 de cmc.). En ajoutant à cette toxine 1,2 % de formol à 35 % en laissant 40 jours à 40°, et en agitant de temps en temps le mélange, il prépare des « anatoxines vraies », c'est-à-dire absolument exemptes de toxicité. Pourtant il ne semble pas qu'il en obtienne toujours, puisqu'il dit ne considérer un vaccin comme utilisable, que si les souris le supportent en injection intraveineuse à la dose de 0,5 cmc., et les lapins de 10 cmc.

J. DUMAS insiste encore sur la quantité de formol à ajouter et la question du pH :

Quantité de formol à ajouter. — Selon la toxicité du filtrat, il faudra une proportion variable de formol pour obtenir le maximum d'atténuation. Des toxines faibles (pathogènes pour le lapin à des doses allant de 0,1 cmc. à 0,013 cmc.) sont facilement atténuées par une quantité de formol de 0,4 à 0,6 %. Des toxines plus fortes (pathogènes aux doses de 0,01 cmc., 0,006 cmc., 0,005 cmc.) sont irrégulièrement atténuées par une proportion de formol de 0,6 à

0,1 %. Beaucoup tuent le lapin à la dose de 5 cmc., quelques-unes après injection de 10 cmc. Exceptionnellement, à cette dose, la toxine formolée n'est pas pathogène pour le lapin.

Une quantité de 12 % de formol, additionnée à une toxine tuant le lapin au 1/100 de centimètre cube, diminue le pouvoir antigène. Il est donc impossible de préciser la quantité optima de formol à ajouter au filtrat, pour détruire sa propriété toxique tout en conservant son pouvoir antigène.

D'autre part, contrairement à ce que prétendent LESBRE et VERDEAU, il semble que l'addition fractionnée de formol diminue la toxicité. En effet, si on ajoute 0,4 % de formol à deux litres d'une toxine pathogène pour le lapin à la dose de 0,006 cmc. et qu'on laisse un mois à 40°, le produit obtenu tuera le lapin à la dose de 1 cmc. en injection intraveineuse. Si on ajoute encore 2 cmc. de formol à 0,5 % et qu'on laisse un mois à 40°, il faudra 10 cmc. de ce nouveau mélange pour causer la mort de l'animal.

Action du pH. — L'addition de 0,6 % de formol diminue l'alcalinité des toxines et les fait passer de pH 8,8 à pH 8,0.

Le degré d'acidité ionique d'une anatoxine, avant sa formolisation, ne paraît pas avoir d'influence sur son atténuation. Avec la même toxine tuant le lapin à raison de 0,01 cmc., DUMAS fait 3 lots de 2 flacons. Le premier lot est ajusté à pH 6,4, le deuxième à 7,8 et le troisième à 9. Il formole ensuite un flacon de chacune de ces 3 séries à 0,4 % et l'autre à 0,8 %. Au bout d'un mois de séjour à 40°, il injecte 10 cmc. de chacune de ces toxines formolées à des lapins. Tous les animaux sont morts d'intoxication dysentérique en quelques jours.

Signalons enfin que d'autres substances telles que l'hydrate de chloral, l'acide acétique, l'acétone, l'urotropine et l'hexaméthylène tétramine, l'acide lactique à 30 % ont la propriété de moins modifier le poison dysentérique que l'aldéhyde formique.

Quelles sont maintenant les propriétés de la toxine formolée ? Le chauffage d'une heure à 65° en altère le pouvoir antigène. Le chauffage d'une heure à 100° le détruit. La toxine formolée laissée à l'étuve à 50° s'atténue rapidement en 6 à 10 jours, mais après un mois, son pouvoir antigène est diminué. Des lapins vaccinés avec des injections de 1 et 2 cmc. à 15 jours d'intervalle ne résistent pas à l'inoculation intraveineuse de 5 doses mortelles de culture de bouillon.

L'exposition pendant 50 heures aux rayons du soleil diminue ses propriétés immunisantes. Sa toxicité s'atténue à la longue à la température du Laboratoire, mais son pouvoir antigène se conserve même après 6 ans.

Pour obtenir donc une bonne toxine formolée, la température optima paraît donc être 40° et il semble inutile de prolonger au delà d'un mois le séjour à l'étuve.

*
* *
*

Nous avons employé pour nos expériences de vaccination, 3 toxines formolées préparées à des dates différentes :

L'une, la toxine n° 27, pathogène pour le lapin à la dose de 1/100 cmc., a été formolée le 9 mai 1932.

La deuxième, n° 33, qui tuait à la même dose, a été formolée le 11 mai 1935.

La dernière, n° 34, tuait le lapin au 1/200 et a été formolée le 2 mars 1935.

Nous préparons toujours l'anatoxine de la même façon : dans un flacon stérilisé, on verse deux litres de toxine dysentérique, puis 12 cmc. de formol à 40 %, on bouche avec un bouchon de caoutchouc et on mélange en renversant le flacon. On laisse le récipient 40 jours à l'étuve à 40° et on agite la toxine deux fois par semaine.

II. — Immunisation avec la toxine formolée.

a) *Toxicité de nos toxines formolées.* — Avant de procéder à l'immunisation de nos animaux, nous avons titré comme

nous l'avions fait précédemment, la toxicité des anatoxines. Nous avons injecté par voie intraveineuse à des lapins 5 et 10 cmc. des toxines formolées 27, 33 et 34.

L'injection de 5 cmc. a été dans les trois cas caractérisée par un amaigrissement transitoire. Celle de 10 cmc. a déterminé la mort, soit au cours d'une affection dysentérique typique, soit à la faveur d'une maladie intercurrente s'installant chez un lapin amaigri et paralysé.

L'injection sous-cutanée de 10 cmc. est en général bien supportée. Celle de 20 cmc. provoque des paralysies et amène la mort. A l'autopsie, on trouve des lésions hémorragiques du cæcum.

La souris est sensible à l'injection de toxine formolée : la dose minima mortelle de nos produits était comprise entre 0,25 et 0,1 cmc.

Signalons enfin que l'injection sous-cutanée de 5 cmc. à un cobaye ou de 20 cmc. à un chien est parfaitement tolérée.

Le singe, par contre (surtout les variétés Rhésus, Papions et Callitriches), est très sensible au reliquat de poison que renferme la toxine formolée. L'injection sous-cutanée de 0,5 cmc. ou de 1 cmc. d'anatoxine détermine des lésions de dysenterie expérimentale entraînant la mort en quelques jours. Vingt-quatre ou quarante-huit heures après l'inoculation, l'animal moins vif s'accroche difficilement au treillage de la cage et se laisse prendre. Le lendemain, les membres antérieurs, puis les membres postérieurs se paralysent, ce qui annonce l'apparition d'une quadriplégie flasque, complète, qui force l'animal à rester étendu. Il maigrit, devient somnolent, émet des selles diarrhéiques et meurt en 3 à 4 jours.

L'autopsie décèle une légère infiltration hémorragique au point d'inoculation, constituée par de l'œdème contenant des globules rouges, des lymphocytes et des polynucléaires. Les parois du cæcum, du côlon transverse et de l'anse sigmoïde sont infiltrées d'œdème. La muqueuse est saillante, épaissie, parsemée de suffusions sanguines et de nombreuses ulcérations superficielles. Celles-ci ont de

quelques millimètres à 1/2 centimètre de diamètre, et sont recouverts d'un enduit gris, reliquat de la muqueuse nécrosée par la toxine dysentérique.

Parfois la paroi du grêle, au niveau de l'iléon, est épaissie et congestionnée. Le foie est atteint de dégénérescence graisseuse, les poumons congestionnés, la rate et les reins normaux. La vessie distendue est remplie d'urine claire, non albumineuse.

Les étalements de sang et les frottis d'organes n'ont décelé aucun microbe. Dans l'hémoculture aucune bactérie ne s'est développée ; enfin l'ensemencement des selles n'a pas permis d'isoler de bacilles dysentériques.

b) *Valeur antigène.* — Une fois déterminée la toxicité de l'anatoxine, il reste à savoir sa valeur comme vaccin, comme antigène. On peut, comme nous l'avons fait déjà, immuniser des lapins et les éprouver avec plusieurs doses mortelles. GRILLO reprenant des expériences de HENSEVAL et NÉLIS, conseille, avant de suivre cette méthode, de faire un dosage préalable des toxines formolées ; il prétend que l'activité immunisante d'une anatoxine est fonction de son pouvoir fixateur d'antitoxine.

Des quantités constantes d'anatoxine sont additionnées d'une unité internationale de sérum. GRILLO laisse ces mélanges en contact 2 heures à 37°, et ajoute à chacun d'eux une fraction de « L + » (1) allant de 1 à 0,1 dose.

Dans cette expérience qui rappelle en quelque sorte la fixation de l'alexine, l'anatoxine ne fixe pas la totalité de l'antitoxine du sérum ; une partie reste donc libre et neutralise une fraction de L +. Pour connaître la valeur exacte de cette fraction, on inocule très lentement dans la veine des souris, 0,5 cmc. de chaque mélange. Les animaux sont observés 4 jours. Les souris qui ont reçu les plus grandes fractions de L + meurent. A partir d'une certaine dose, elles résistent ; et l'on sait, quand survivent 66 % des souris,

(1) Le « L + » d'une toxine est la dose qui, mélangée à une unité antitoxique, détermine la mort de 66 % des souris inoculées.

TABLEAU N° 18.
VACCINATION AVEC LA TOXINE FORMOLÉE, INJECTÉE PAR VOIE SOUS-CUTANÉE

Toxine formolée employée	Numéros des lapins et poids	Quantité de toxine formolée injectée par voie sous-cutanée	Observations	Unités anti-toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	
27	A. 65 2 k. 120	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³	Parésie transitoire du train postérieur	0	200 doses de toxine sèche	+ en 24 heures, léger œdème cœcal.
	A. 79	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³	Parésie transitoire du train postérieur	2	150 doses mortelles de toxine sèche	Quadruplégie, coma + en 5 jours œdème cœcal, rétention vésicale.
	1 k. 800	2 ^e inj. 1 cm ³				
	A. 61	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³	Parésie transitoire du train postérieur	2	100 doses mortelles de toxine sèche	+ en 12 heures. Pas de lésion macroscopique.
	2 k. 100	2 ^e inj. 1 cm ³				
	A. 69 2 k. 130	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		2	50 doses mortelles de toxine sèche	+ en 12 heures. Pas de lésion macroscopique.
	A. 77 2 k. 480	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		2	26 doses mortelles de culture en bouillon	Survie. Léger amaigrissement.
	A. 71 2 k. 380	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		2	16 doses mortelles de culture en bouillon	Survie. Léger amaigrissement.
	A. 73 2 k.	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	10 doses mortelles de culture en bouillon	Survie.

D. 70 2 k. 340	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³	Quadriplégie, coma, mort en 12 j., œdème coecal, rét. vésic.			
D. 71 1 k. 900	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³	+ en 14 jours, œdème coecal	4	100 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
D. 69 2 k. 320	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		4	75 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
D. 68 2 k. 010	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		8	60 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
D. 25 2 k. 600	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		8	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
D. 24 2 k. 180	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
D. 28 1 k. 850	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		8	26 doses mortelles de culture en bouillon	Survie. Amaigrisse- ment.
D. 67 2 k. 380	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		8	16 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie. Amaigrisse- ment.
D. 66 2 k. 050	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³				
D. 90 2 k. 340	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		4	75 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Amaigrisse- ment passager.
D. 91 2 k. 190	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		4	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Amaigrisse- ment.
D. 88 1 k. 750	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		0	25 doses mortelles de toxine liquide	+ en 48 heures, lé- ger œdème coecal. Rétention vésicale.
D. 72 2 k. 570	1 ^{re} inj. 0,5 cm ³ 2 ^e inj. 1 cm ³		8	20 doses mortelles de cult. en bouillon	+ en 12 heures. Pas de lésion macros- copique.

33

34

la quantité exacte d'antitoxine restée libre, et par conséquent, celle qui a été fixée par la toxine formolée. GRILLO considère une anatoxine comme utilisable, quand 0,1 cmc. de cette toxine formolée fixe 6 ou 7/10 d'unités antitoxiques, autrement dit quand sa limite d'activité est de 6 ou 7.

Nous pensons que, quelle que séduisante que soit cette méthode, il est plus simple, comme nous l'avons fait jusqu'alors, de commencer par immuniser les lapins par voie sous-cutanée et intradermique et de les éprouver après, avec plusieurs doses mortelles.

c) *Immunisation par voie sous-cutanée.* — Les lapins reçoivent deux injections sous-cutanées de 0,5 cmc. et de 1 cmc., à 3 semaines d'intervalle. Vingt et un jours après la dernière inoculation, on les éprouve.

Dans le tableau n° 18 on voit que :

1° L'injection sous-cutanée de toxine formolée n'est pas sans danger puisque quelques lapins ont présenté une paralysie du train postérieur et que l'un d'eux est mort de lésions dysentériques typiques.

2° La toxine formolée protège les lapins parfois, mais pas toujours, contre 26 doses mortelles de culture en bouillon.

3° Elle les immunise contre 100 et 75 doses de toxine liquide, mais pas contre 50 doses mortelles de toxine sèche.

4° La plupart des sérums des animaux survivants, titraient plusieurs unités. Pourtant, quelques-uns n'avaient aucun titre antitoxique décelable. D'autres lapins qui ne devaient pas survivre avaient un sérum à titre élevé.

d) *Vaccination par voie intradermique.* — Les lapins reçoivent, également à 3 semaines de distance, 0,25 cmc. de toxine formolée n°s 27, 33 et 34. On les éprouve 21 jours après la dernière injection.

Dans le tableau n° 19 se trouvent les résultats de cette immunisation.

1° Les lapins semblent avoir bien supporté l'inoculation intra-dermique, puisque nous n'avons constaté ni mort, ni même paralysie dysentérique.

TABLEAU N° 19.

VACCINATIONS AVEC LA TOXINE FORMOLÉE, INJECTÉE
PAR VOIE INTRADERMIQUE

Toxine formulée employée	Numéros des lapins et poids	Quantité de toxine formolée injectée par voie intra-dermique	Observations	Unités anti- toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
27	B. 55 1 k. 720	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³	Réaction in- flammatoire	0	100 doses mortelles de toxine sèche	Survie, amaigr. et paralysie transit.
	B. 57 2 k. 300	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		0	50 doses mortelles de toxine sèche	Quadriplégie, coma + en 4 jours : œ- dème cœcal et ré- tention vésicale.
	B. 59 2 k. 020	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		0	25 doses mortelles de toxine sèche	Quadriplégie, coma + en 8 jours, œdè- me cœcal, réten- tion vésicale.
	B. 69 2 k. 350	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		0	26 doses mortelles de culture en bouil- lon	Paralysie, amaigris- sement, + en 5 j. de pneumococ. Lé- ger œdème cœcal.
	B. 65 2 k. 300	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		0	13 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie. Amaigrisse- ment.
33	D. 95 2 k. 180	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³	Réaction infl. locale	4	100 doses mortelles de toxine liquide	Survie. Amaigrisse- ment.
	D. 96 1 k. 600	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		0	75 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie, coma + en 4 jours, œdè- me cœcal et réten- tion vésicale.
	D. 40 2 k. 450	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		8	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 41 2 k. 420	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		8	26 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie. Amaigrisse- ment.
34	D. 98 1 k. 800	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		0	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 99 2 k. 000	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		6	25 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
	D. 94 1 k. 850	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		8	26 doses mortelles de culture en bouil- lon	+ en 12 heures, pas de lésion macros- copique.
	D. 97 1 k. 850	1 ^{re} inj. 1/4 cm ³ 2 ^e inj. 1/4 cm ³		8	13 doses mortelles de cult. en bouillon	Survie.

2° Les lapins ont résisté généralement à 26 ou à 13 doses mortelles de culture en bouillon, ou à 100 et 50 doses de toxine liquide.

3° Ils ont mal résisté à l'injection de toxine sèche, mais on est encore obligé d'invoquer la sensibilité spéciale du lapin, puisque l'un a supporté 100 doses de cette toxine, et que d'autres ont été tués par 50 et même 25 doses. Le même phénomène s'est produit encore après injection de la toxine liquide (un lapin a survécu à 100 doses mortelles, un autre n'a pas supporté 75 doses).

4° Il n'y a pas toujours de rapport entre les doses d'antitoxine du sang, et la résistance à l'intoxication ; certains animaux ont résisté à 50 doses mortelles de toxine liquide sans qu'on puisse déceler d'antitoxine dans leur sérum.

CHAPITRE V

Immunisation au moyen de vaccins associés.

C'est en 1926 que RAMON et ZOELLER essayent l'immunisation avec des vaccins associés, c'est-à-dire avec un mélange de 2 antigènes dissemblables dans leur nature : une anatoxine et un vaccin microbien anti-typho-paratyphique. Cette idée leur vint en observant les réactions des chevaux en cours d'immunisation contre la diphtérie. A partir d'un certain nombre d'injections, le taux de l'antitoxine du sérum reste stationnaire, sauf si le cheval présente un abcès. Dans ce cas, il y a surproduction d'antitoxine. Il n'est pas nécessaire d'avoir un abcès septique, ce qu'il faut, c'est obtenir un œdème inflammatoire. RAMON injecte alors au cheval du tapioca, en même temps que l'antigène, et obtient un immun-sérum à titre élevé.

Chez l'homme, pour jouer le même rôle, Ramon et Zoeller emploient en raison des réactions trop vives dues au tapioca, un vaccin anti-typho-paratyphique. Ils commencent par un mélange d'anatoxine tétanique et de vaccin T. A. B., et devant les excellents résultats obtenus, appliquent cette méthode aux anatoxines diphtériques et staphylococciques. On connaît aujourd'hui le succès de ces vaccinations.

Nous avons injecté par voie sous-cutanée à des lapins, un mélange composé de 0,5 cmc. de toxine formolée n° 33, et de 1 cmc. de vaccin T. A. B. 3 semaines après, on inoculait 1 cmc. de chacun de ces produits. Au bout de 21 jours, on éprouvait les animaux. Nous avons obtenu,

IMMUNISATION AVEC DES VACCINS ASSOCIÉS

Numéros des lapins et poids	Quantité de vaccin injecté	Observations	Unités anti- toxiques du sérum	Dose d'épreuve par voie intra-veineuse	Résultats
A. 49 2 k. 500	1 ^{re} injection : 0,5 cm ³ toxine form. + 1 cm ³ T. A. B.	Paralysie amaigrissement, rémission + en 1 mois de pneumonie			
A. 37 2 k. 550	1 ^{re} injection : 0,5 cm ³ toxine form. + 1 cm ³ T. A. B.	Quadriplégie coma + en 18 jours, œdème cœcal, rétention vésicale			
A. 41 2 k. 600	1 ^{re} injection : 0,5 cm ³ toxine form. + 1 cm ³ T. A. B. 2 ^e injection : Toxine form. { ââ T. A. B. { 1 cm ³	Forte réaction inflammatoire locale	0	200 doses mortelles de toxine liquide	Amaigrissement. Survie.
A. 39 3 k. 150	1 ^{re} injection : 0,5 cm ³ toxine form. + 1 cm ³ T. A. B. 2 ^e injection : Toxine form. { ââ T. A. B. { 1 cm ³		0	100 doses mortelles de toxine liquide	Quadriplégie com + en 4 jours, œd me cœcal et réter tion vésicale.
A. 47 1 k. 800	1 ^{re} injection : 0,5 cm ³ toxine form. + 1 cm ³ T. A. B. 2 ^e injection : Toxine form. { ââ T. A. B. { 1 cm ³	Réaction in- flammatoire locale	0	50 doses mortelles de toxine liquide	Survie.
A. 43 2 k. 500	1 ^{re} injection : 0,5 cm ³ toxine form. + 1 cm ³ T. A. B. 2 ^e injection : Toxine form. { ââ T. A. B. { 1 cm ³	Réaction in- flammatoire locale	0	75 doses mortelles de culture en bouil- lon	+ en 2 jours, lég œdème cœcal, r tention vésicale congestion pulm naire intense
A. 45 2 k. 100	1 ^{re} injection : 0,5 cm ³ toxine form. + 1 cm ³ T. A. B. 2 ^e injection : Toxine form. { ââ T. A. B. { 1 cm ³	Réaction in- flammatoire lo- cale	0	50 doses mortelles de culture en bouil- lon	Quadriplégie, ama grissement. Survie
A. 35 2 k. 050	1 ^{re} injection : 0,5 cm ³ toxine form. 1 cm ³ T. A. B. 2 ^e injection : Toxine form. { ââ T. A. B. { 1 cm ³	Faible réaction inflammatoire locale	0	25 doses mortelles de culture en bouil- lon	Survie.

comme nous l'avons exposé dans le tableau n° 20 les résultats suivants :

1° La 1^{re} injection a causé la mort de 2 lapins ; l'un est mort en 18 jours de dysenterie typique ; l'autre d'affection intercurrente.

2° La plupart des lapins ont fait après la première injection, une faible réaction inflammatoire locale.

3° Ils ont résisté à l'épreuve de 200 doses mortelles de toxine liquide et de 50 doses de culture en bouillon (chiffre que nous n'avions pas encore obtenu).

4° Un lapin immunisé dans les mêmes conditions que les autres, n'a pas résisté à 100 doses de toxine liquide. Notons qu'il n'a pas fait de réaction inflammatoire après la première injection.

5° Nous n'avons pas décelé d'antitoxine dans le sérum des animaux éprouvés.

CONCLUSION DE LA TROISIÈME PARTIE

1° Les toxines non modifiées ou précipitées, si elles immunisent bien le lapin, sont des produits trop dangereux pour être employés, car ils risquent d'amener la mort de l'animal dès la première inoculation.

2° La toxine formolée qui donne cependant de bien meilleurs résultats, n'est pas non plus dépourvue de toute toxicité : elle cause la dysenterie expérimentale du singe ; injectée par voie intraveineuse au lapin, elle le tue à la dose de 10 cmc. et par voie sous-cutanée, provoque quelquefois à la dose de 0,5 cmc. des paralysies et même la mort de certains animaux.

3° L'anatoxine semble mieux supportée par voie intradermique. C'est peut-être en raison de la petite quantité de produit injecté ou de la résorption plus lente de l'antigène.

4° L'immunisation avec la toxine formolée par les voies sous-cutanée ou intradermique, est aussi satisfaisante : les lapins résistent à 100 doses mortelles de toxine liquide et à 13 ou 26 doses de culture en bouillon.

5° La vaccination mixte a donné d'excellents résultats : survie du lapin après injection de 20 doses de toxine liquide et surtout de 50 doses de culture en bouillon. Par contre, la première injection a déterminé la mort d'un animal avec des lésions dysentériques.

6° Les animaux semblent plus sensibles, comme nous l'avons déjà constaté, à l'injection de plusieurs doses de culture en bouillon ou de toxine sèche, que de toxine liquide. Il faut également insister sur la sensibilité particulière du lapin, puisque, dans le même lot, des animaux éprouvés avec une grande dose de toxine ont survécu, alors que sont morts d'autres lapins qui avaient reçu une dose inférieure.

7° Il ne semble pas y avoir de différence au point de vue valeur antigène entre les 3 toxines formolées utilisées.

8° Le dosage de l'antitoxine des sérums, comparé à la résistance des animaux éprouvés, nous a donné comme précédemment, des résultats inconstants.

CONCLUSIONS

1° Parmi les différentes méthodes d'immunisation que nous avons employées, celles, qui ont donné les moins bons résultats, sont l'injection d'émulsions chauffées et la vaccination par voie digestive.

2° L'immunisation avec la toxine liquide ou précipitée, est également à rejeter en raison de la nocivité de ces produits et de leur valeur antigène médiocre.

3° Les autolysats filtrés et les émulsions formolées se sont montrés meilleurs antigènes.

4° Nous avons eu encore plus de succès avec les lipo-vaccins tués ou vivants, qui protègent l'animal contre 75 doses mortelles de toxine liquide, et avec l'anatoxine qui vaccine contre 100 doses.

5° Des lapins vaccinés avec des émulsions vivantes ont résisté à 150 doses mortelles ; des animaux immunisés avec des vaccins mixtes, ont supporté 200 doses de toxine liquide.

6° Les lapins vaccinés sont plus sensibles à l'injection du même nombre de doses mortelles de cultures vivantes en bouillon ou de corps microbiens desséchés que de toxine liquide.

7° Il n'y a pas de différence au point de vue toxicité ou valeur antigène entre les variantes « Rough » et « Smooth » d'une même souche de bacilles de Shiga.

8° Quels que soient les produits employés, nous n'avons

pu obtenir de vaccins efficaces qui ne choquent pas l'animal. Les émulsions vivantes sont éminemment toxiques ; les vaccins huileux, la toxine formolée et les vaccins mixtes, le sont beaucoup moins. Signalons toutefois, qu'en injectant l'anatoxine par voie intradermique, nous n'avons pas provoqué de symptôme d'intoxication. Cette tolérance peut-être due à la petite quantité de produit introduite dans l'organisme ou à la lenteur de résorption de l'antigène. Mais nous ne voudrions pas affirmer l'inocuité de cette vaccination d'après un petit nombre d'expériences, et nous nous contenterons de conclure, que l'immunisation active du lapin contre le bacille de Shiga avec un vaccin à la fois actif et inoffensif reste un problème que nous n'avons pas pu résoudre.

Vu : le Président de la thèse,

LAUBRY.

Vu : le Doyen,
ROUSSY.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHARD (Ch.) et FOIX (Ch.). — Sur l'emploi des corps gras comme véhicules des vaccins microbiens. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1916, t. 79, p. 209.
- ARKWRIGHT (J. A.). — Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1921, t. 24, p. 36.
- The source and characteristics of certain cultures sensitive to bacteriophage. *The British Journal of experimental Pathology*, 1924, t. 5, p. 23.
 - The value of different Kinds of antigen in Prophylactic « enteritic » vaccines. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1927, t. 30, p. 345.
 - Variation of Bacteria. *1^{er} Congrès International de Microbiologie*, 1930, p. 147.
 - Variation. Chapitre IX, p. 310 du *System of Bacteriology*, t. 1, passim.
- DE ASSIS (A.). — Da acção do formol sobre a toxina dysenterica. Sobre a flocculação do soro antidysenterico. *Archivos de Instituto Vital Brazil*, Junho, 1925, t. III, fas. 1.
- Ueber die Shiga Toxoid und ihre Verwendung in der Herstellung antitoxischer Dysenteriesera. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentale Therapie*, 1929, t. 64, p. 49.
- BAERTHLEIN (K.). — Ueber Mutationsercheinungen bei Bakterien. *Arbeit an der Kaiserliche gesundheitsamte Berlin*, 1912, 40, 4, p. 433.
- Ueber Bakterielle Variabilität, insbesondere sogenannte Bakterien mutationen. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, 1918, *Origin.*, t. 71, p. 369.
- BALSAMELLI. — Action des toxines staphylococciques et dysentériques (Shiga) et des staphylocoques vivants inoculés après leur enrobage dans la lanoline ou dans un mélange

- de cholestérine et d'huile d'olive. *Bolletino de la Sezione Italiana*, 1935 A XIII, p. 203.
- BALTEANO (J.). — La vaccination antidysentérique par la voie cutanée chez le lapin. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1923, t. 88, p. 943.
- BESREDKA (A.). — Du mécanisme de l'infection dysentérique. De la vaccination contre la dysenterie par la voie buccale et de la nature de l'immunité antidysentérique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1919, t. 30, p. 394.
- BLANC (G.) et CAMINOPETROS (J.). — Contribution à l'étude expérimentale de la vaccination antidysentérique appliquée à l'homme, par voie buccale et par voie sous-cutanée. La vaccination par bacilles vivants. *Revue d'Hygiène et de Médecine préventive*, 1928, t. 50, p. 321.
- BOEHNCKE, HAMBURGER et SCHELENZ. — Untersuchungen über Ruhrimpfstoffe *in vivo* und *in vitro*. *Berlin Klinische Wochenschrift*, 1918, p. 134.
- BROUGHTON-ALCOCK. — Antidysenteric vaccination. *British Medical Journal*, 1914, p. 306.
- CALALB (J.) et CRIVAT (D.). — Les variantes S et R du bacille de Shiga et leurs propriétés antigéniques. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1936, t. 123, p. 59.
- CHIBA. — Die verwendung der trockenenen hitze bei herstellung von Vakzinen (Dysenteriebakterien). *Centralblatt für Bakteriologie*, 1922, t. 88, p. 79.
- CHVOSTEK (F.). — Zur Frage der Immunisierung per os. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1908, n° 14.
- COMBIESCO (D.), MAGHERU (A) et CALALB (G.). — Vaccination préventive contre la dysenterie par la voie digestive, chez le lapin. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1923, t. 88, p. 904.
- CONRADI (H.). — Über lösliche durch aseptische Autolyse erhaltene giftshoffe von Ruhr und Typhusbazillen. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 1903, t. I, p. 26.
- COPPINGER et ROBERTSON. — Preliminary experiments with a view to the preparation of a non toxic dysentery vaccine. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 1922, t. 38, p. 243.
- COWAN (M.). — Variation phenomena in streptococci. Further studies on virulence and immunity in mice and rabbits. *British Journal of experimental Pathology*, 1924, t. 4, p. 226.

- DEAN (H. R.) et ADAMSON (R. S.). — A method for the preparation of a non toxic Dysentery Vaccine. *British Medical Journal*, 1916, p. 611.
- DITTHORN (F.) et LÆWENTHAL (W.). — Ein neuer multivalenter Ruhr Schutzimpfstoff. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 1917. n° 31, p. 966.
- DOERR (R.). — Das dysenterie toxin. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1905, t. 19, n° 41.
- Das dysenterie toxin. *Iena*, G. Fisher, 1907.
- DOPTER (CH.). — Vaccination antidysentérique expérimentale. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1907, t. 53, p. 379.
- Vaccination préventive contre la dysenterie bacillaire. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909, t. 23, p. 677.
- *Les dysenteries, études bactériologiques*. Doin, éditeur, 1909.
- DUMAS (J.), RAMON (G.) et SAID BILAL. — Les propriétés immunisantes de l'anatoxine dysentérique. *Paris Médical*, 1924, t. 53, p. 480.
- Anatoxine dysentérique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1926, t. 40, p. 134.
- ENLows (E.). — Vaccination by mouth against bacillary dysentery. *Public Health Reports*, 1925, t. 40, p. 639.
- FROUIN (A.), et MOUSSALI (A.). — Action des sels de terres rares sur les bacilles dysentériques. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1919, t. 82, p. 973.
- FUKAHARA. — A new method of festing antitoxic dysentery serum. *Journal of Immunology*, 1919, t. 4, p. 299.
- GARDNER. — The dysentery group bacilli. *A system of Bacteriology*, t. IV, *passim*.
- GREENWOOD (M.), TOPLEY (W. C.), WILSON (J.). — Contributions to the experimental study of epidemiology. *Journal of Hygiene*, vol. XXXI, 1931, p. 257.
- GRILLO (J.). — *Experimentallle Untersuchungen über die Schutzimpfung gegen die Shigaruhr*, *passim*.
- GRINNEL (FRANCIS B.). — A study of the comparative value of Rough and Smooth strains of B. Typhosus in the preparation of Typhoid vaccines. *Jour. of Immunology*, t. 19, 1930, p. 456.
- Studies on the Relationship of certain variants of B. Typhosus. *The Jour. of Experimental Medicine*, 1931, t. 54, p. 578.

- A study of dissociation of the Rawlins Strain of *Bacterium typhosum* with special reference to its use in the production of Antityphoid vaccine. *Ibidem*, 1932, 2, t. 56, p. 907.
- HENSEVAL et NELLIS. — Recherches sur la vaccination antidiptérique à l'aide de l'anatoxine. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1924, p. 902.
- HIDA (O.) et TOYODA (H.). — Aktive immunisierung per os. *Saikingaku-Zassi*, 1907, n° 138, d'après le *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Referate*, 1909, p. 418, t. 42.
- HORNUS (G.) et BAUDOUY (C.). — Recherches sur la dissociation de bacilles paratyphiques A. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1935, t. 118, p. 341.
- Recherches sur la dissociation des bacilles paratyphiques A. *La réaction de Millon*, *ibidem*, 1935, t. 118, p. 634.
- Recherches sur la dissociation des bacilles paratyphiques A. *Les agglutinations non spécifiques*, *ibidem*, t. 118, p. 1288.
- HUTTIG (M.). — Tier Versuche zur Schutzimpfung durch Fütterung gegen echte Ruhr und zum Nachweis der sog. Enterotropie von Darminfection erregern und giften. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, 1930, t. 119, p. 133.
- IBRAHIM et SCHÜTZE. — A comparison of the prophylactic values of the H, O, and R antigens of *Salmonella*, *Ærtrycke*, together with some observations on the toxicity of its smooth and rough variants. *The Journal of Experimental Pathology*, 1928, t. 9, p. 253.
- ISABOLINSKI (M. P.) et KARPATSCHEWSKAJA (B.-P.). — Über Dysenterie Anatoxin. *Zeitschrift für Immunitätsforschung*, 1931, t. 71, p. 213.
- JOHNSON (J.) et MILNE (A.-J.). — Combined preventive inoculation against typhoid and paratyphoid fever and bacillary dysentery. *British Med. Journal*, 1916, p. 88.
- JONESCO, MIHAESTI et POPESCO (C.). — L'influence de la concentration en ions H sur le développement et la production de toxine par le bacille de Shiga. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1922, t. 86, p. 893.
- JÖTTEN. — Die verwendung neutralisierter antiformin. Bakterienauflösungen zur Gewinnung hochwertiger agglutinierender Ruhrimmunsera. *Zeitschrift für Immunitätsforschung*, 1920, t. 29, p. 2.267.

- KANAI (S.). — Dysentery immunization in rabbit by the oral and subcutaneous methods. *British Journal of Experimental Pathology*, 1921, t. 11, p. 256.
- KLUCHIN et WOGODTSCHIKOFF. — Weitere Untersuchungen über die Enterovakzination gegen cholera typhus abdominalis und Dysenterie. *Centralblatt für Bakteriologie*, 1925, *originale*, t. 94.
- KOLLE (W.), HELLER (O.) et DE MESTRAL (V.). — Untersuchungen über dysenterie toxin, das dysenterieserum und seine Wertbestimmung. *Arbeiten aus dem Institut zur erforschung der Infektions Krankheiten*, in Bern, 1908, Heft, I, p. 1.
- KRAUS (R.), AWOKI (T.) et KOVACS (N.). — Über Aktive Immunisierung mit atoxischen Kulturfiltraten. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentale Therapie*, 1926, t. 45, p. 42.
- KRUSE. — Weitere untersuchungen über die Ruhr und die Ruhrbazillen. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 1901, t. 1, p. 386.
- LAUBENHEIMER (K.). — Über die Einwirkung von Metallen und Metallsalzen auf Bakterien und Bakteriengifte. Versuche zur praktischen Verwertung der olygodynamischen Wirkung von Metallen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1921, t. 92, p. 79.
- LEGROUX (R.). — Dissociation et variabilité des bactéries. *Annales des fermentations*, 1935, t. I, p. 193.
- LEGROUX (R.) et MAGROU (J.). — Etat organisé des colonies bactériennes. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1920, t. 34, p. 417.
- LENTZ (O.) et PRIGGE (R.). — Infectiöse Ruhr und Ruhrbazillen. *Handbuch der Microorganismen*, t. 3, p. 1.377.
- LESBRE (Ph.). — Immunisations expérimentales par anatoxine contre le bacille de Shiga. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1925, t. 93, p. 612.
- LESBRE (Ph.) et VERDEAU (A.). — Quelques particularités de l'anatoxine dysentérique. *Ibidem*, 1925, t. 92, p. 165.
- LUDKE (H.). — Untersuchungen über die bacilläre Dysenterie. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde O.*, 1906, t. 40, p. 290.
- Über die Gewinnung von Dysenterie toxin. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1906, p. 3.
- LÜRJE (M.), ROSENBLATT (A.) et KASSAREW (N.). — Die Dysenterie Anavakzine Shiga Kruse und ihre vakzienierenden Eigenschaften. *Zeitschrift für Immunitätsforschung*, 1920, t. 61.
- MALTANER FRANK. — A Study of Smooth and Rough Forms of

- the typhoïde Bacillus in relation to prophylactic vaccination and immunity in Typhoïd Fever. *Journal of Immunology*, 26, 1934, p. 161.
- MARBOIS (S.). — Vaccinothérapie spécifique dans la dysenterie bacillaire. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1918, 81, p. 919.
- MARREY (P.) et VAZ (E.). — Immunização per os. *Memorias do Instituto de Butantan*, 1926, p. 77.
- MESROBEANU (L.) et CALALB (C.). — Sur l'antigène somatique glucido-lipidique. Propriétés chimiques. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1936, t. 122, p. 496.
- LE MOIGNIC et PINOI. — Les vaccins en émulsion dans les corps gras ou lipo-vaccins. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1916, t. 79, p. 201.
- NEISSER (M.) und SHIGA (K.). — Über freie Receptoren von Typhus und Dysenterie bazillen und über das Dysenterie toxin. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 1903, t. 1, p. 60.
- NICOLLE (M.), DEBAINS (F.), et LOISEAU. — Etudes sur le bacille de Shiga. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1916, p. 364.
- OLIZKY (P.-K.). — An experimental study of vaccination against Bacilli Dysenteriae. *The Journal of experimental Medicine*, 1918, t. 28, p. 69.
- OLITZKY (P.-K.) et KLIGER (J.-J.). — Toxins and antitoxins of bacillus Dysenteriae Shiga. *Journal of experimental Medicine*, 1920, t. 31, p. 19.
- OTTEN (L.) und KIRSCHNER (L.). — Über enterale und parenterale Immunisierung gegen bacilläre Dysenterie (Shiga-Kruse). *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1927, t. 107, p. 314.
- PAMPANA (E.). — Microbic dissociation : detection of the R variants by means of a specific drop agglutination. *Journal of Hygiène*, 1933, t. 33, p. 402.
- PATAY (R.). — Contribution à l'étude de la toxicité du bacille dysentérique Shiga. *Thèse de Paris*, 1926. Amédée Legrand éditeur.
- PERRY (M.-H.), FINDLAY et BENSTED). — Antityphoïd Inoculation. The Role of Bacterium Typhosum, strain Rawlings. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, avril 1933, t. 40, p. 241.
- Antityphoïd Inoculation. Observations on the Immunizing properties and on the manufacture of typhoïd Vaccine. *Ibidem*, mars 1934, t. 42, p. 162.

- PERRY (M.-H.) et COPPINGER (B.-J.). Observations on the employment of anaerobically grown *Bacillus Dysenteriae* Shiga as a vaccine. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 1925, t. 45, p. 241.
- PETRUSCHKY (J.). — Erfahrungen über percutane Schutzbehandlung bei Ruhr. *Medizinische Klinik Wochenschrift für Praktische Aerzte* 1919, t. 15, p. 864.
- RAMON (G.). — Sur un procédé d'immunisation antitoxique et de production des antitoxines. *Bulletin et Mémoire de la Société centrale Vétérinaire*, 1925, t. 101, p. 348.
- RAMON (G.) et LEMÉTAYER (E.). — Sur une méthode de production rapide et intensive de l'immunité et de l'antitoxine tétanique chez les animaux. Son intérêt pratique et théorique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1935, t. 119, p. 248.
- Sur les suites des injections répétées chez le lapin et dans différentes conditions, de très petites doses de toxine tétanique non atténuée. *Ibidem*, 1935, t. 119, p. 909.
 - Sur l'action immunisante de la toxine tétanique enrobée dans la lanoline chez l'animal d'expérience. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1935, t. 200, p. 592.
- RAMON (G.) LEMÉTAYER (E.) et RICHOU (R.). — De l'influence des substances non spécifiques ajoutées à l'antigène dans la production de l'immunité antitoxique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1934, t. 115, p. 1027.
- Nouveaux essais sur l'influence de l'addition de substances non spécifiques à l'antigène, dans la production de l'immunité antitoxique. *Ibidem.*, 1934, t. 116, p. 823.
 - De l'influence de diverses substances ajoutées à l'antigène anatoxique dans la production de l'immunité antitoxique. *Revue d'Immunologie*, 1935, p. 199.
 - Sur les résultats de l'injection à l'animal d'expérience, de la toxine tétanique mélangée à diverses substances et en particulier à la lanoline. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1935, t. 118, p. 112.
- RAMON (G.) et ZOELLER (Ch.). — Les vaccins associés par union d'une anatoxine et d'un vaccin microbien (T A B) ou par mélange d'anatoxines. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1926, p. 106.
- Sur les vaccinations associées. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1933, t. 197, p. 1361.
 - Les vaccinations associées. Etude théorique ; résultats

- d'ensemble. Indications pratiques. *Revue d'Immunologie*, 1936, p. 415.
- RANQUE (A.) et SENEZ (Ch.). — Essai de vaccination contre le bacille de Shiga. *Revue de Pathologie comparée*, 1918, p. 253, séance du 12 octobre.
- ROSENTHAL (L.). Gesellschaft für Naturkunde Anthropologie und Ethnologie in Moskau. *Centralblatt für Bakteriologie*, 1905, vol. 36, p. 23.
- RUFFER (M. A.) et WILMORE (J. G.). — The Production of immunity against dysentery toxin. *British medical Journal*, 1908, t. 2, p. 1176.
- SAVAGE (W. G.) et WHITE (BRUCE P.). — An investigation of the Salmonella group with special reference to food poisoning. *Privy Council Medical Research*, 1905, n° 91.
- SCHÜTZE (H.). — The Importance of somatic antigen in the production of Artrycke and Gaertner Immunity in mice. *British Journal of Experimental Pathology*, 1930, t. II, p. 34.
- SELTER (H.). — Ueber die Dysenteriegifte. *Zeitschrift für Immunitätsforschung, Originale*, 1910, t. 5, p. 548.
- SIMONETTI. — Su di un vaccino, anti disenterico formolato. *Policlinico, periodico di Medicina chirurgia e Igiene*, 1928, p. 410.
- SHIGA (K.). — Über den Dysenterie bacillus. *Centralblatt für Bakteriologie*, 1898, Bd. 24, p. 913.
- Über versuche zur Schutzimpfung gegen die Ruhr. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1903, Bd. 1, p. 327.
- SHIGA (K.), KAWAMURA et TSUCHIGA (K.). — The standardisation of Dysentery serum. *Société des Nations Comité d'Hygiène*, 1924, ch. 193 (1st. and 2nd. Report).
- SUDMERSEN (H. J.), RUNGE (B. F.), O'BRIEN (R. A.). — Standardization of Anti-Dysentery (Shiga) Serum. *British Journal of Experimental Pathology*, 1924, t. 5, p. 100.
- THIBAUT (P.) et BRAUNBERGER (J.). — Les Variantes R et S du Bacille dysenterique Shiga. *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 1935, t. 120, p. 434.
- Variation antigénique S et R du Bacille de Shiga. *Ibidem*, 1935, t. 120, p. 617.
- THOMSON (J. D.). — Attempts to produce a safe and effective Bacillus Dysenteriae (Shiga) vaccine for prophylactic purposes. *British Medical Journal*, 1916, p. 303.
- TORIKOTA (R.) et FUJIMOTO (A.). — On the cocto-immunogen of

- the Dysentery Bacillus (Shiga type). *The Journal of Immunology*, 1927, t. 13, p. 123.
- TOPLEY (Wwc.). — An adress on the natural acquirement of Immunity. *The Lancet*, 1929, t. 1, p. 1337.
- TOPLEY (W. C.) et AYRTON (J.). — The excretion of B enteridis (Aertrycke), in the faeces of mice after administration by mouth. *The Journal of Hygiene*, t. XXII, 1923, 24, p. 235.
- VAILLARD (L.) et DOPTER (Ch.). — La Dysenterie épidémique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1903, p. 463.
- VAZ (E.). — Imunização per os contro O B. de Shiga. *Memo-rias do Instituto de Butantan*, 1925, p. 99.
- VIOLLE (H.). — Vaccins de microbes tués par le chlorure d'or. *Comptes-rendus de la Société de Biologie*, 1925, t. 93, p. 115.
- WAALER (E.). — Studies on the toxin production of the Shiga Bacilli *The Journal of experimental Medicine*, 1936, vol. 63, p. 1.
- WHERRY (W.-B.) et BOWEN (J.-A.). — Detoxication of Bacterial vaccines by formaldehyde. *The Journal of infectious Diseases*, 1925, t. 37, p. 521.
- WHITE (BRUCE P.). — *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1929, t. 32, p. 87.
- WHITMORE E. R., FENNEL F. A. et PETERSEN. — An experimental investigation of lipovaccines. *Journal of American Medical Association* 1918, t. 60, p. 902.
- WILSON (S.). — The relationship between morphology, colonial appearance, agglutinability, and virulence to mice of certain variants of Bacterium Aertrycke. *Journal of Hygiene*, 1930, t. XXX, p. 40.
- WINTER. — Vergleichende Untersuchungen über die chemischen und biologischen Eigenschaften von Ruhrbazillen. *Zeitschrift für Hygiene*, 1912, t. 70, p. 273.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION : La maladie dysentérique expérimentale du lapin.....	9
Technique.....	18
PREMIÈRE PARTIE	
<i>Vaccination du lapin avec des émulsions microbiennes.</i>	
CHAPITRE I. — Vaccination avec des microbes vivants	22
CHAPITRE II. — Vaccins atténués par un agent physique : la chaleur..	26
CHAPITRE III. — Vaccins additionnés d'un antiseptique.....	31
CHAPITRE IV. — Vaccination du lapin avec un autolysat filtré.....	35
CHAPITRE V. — Lipo-vaccins.....	40
CHAPITRE VI. — Vaccination digestive.....	44
Conclusion de la première partie.....	49
DEUXIÈME PARTIE	
<i>Vaccination avec les deux variantes « Rough » et « Smooth » d'une même souche de bacille de Shiga.</i>	
CHAPITRE I. — Historique de la variation.....	52
CHAPITRE II. — Technique et propriétés sérologiques des souches R et S.....	56
CHAPITRE III. — Vaccination des lapins avec des variantes R et S d'une même souche.....	61
Conclusion de la deuxième partie	71
TROISIÈME PARTIE	
<i>Vaccination avec la toxine dysentérique.</i>	
CHAPITRE I. — Toxine dysentérique.....	74
CHAPITRE II. — Vaccination avec la toxine non modifiée.....	78
CHAPITRE III. — Vaccination avec la toxine précipitée.....	80
CHAPITRE IV. — Vaccination avec la toxine formolée	83
CHAPITRE V. — Immunisation au moyen de vaccins associés.....	95
Conclusion de la troisième partie.	97
CONCLUSIONS.....	99
BIBLIOGRAPHIE.....	101